ENTWICKLUNG EINES TRANSFORMATIONSSYSTEMS FÜR Ustilago maydis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marlis Dahl
aus Preetz

Berlin 1986

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

ENTWICKLUNG EINES

TRANSFORMATIONSSYSTEMS FÜR *Ustilago maydis*

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

M a r l i s D a h l

aus Preetz

Berlin 1986

1. Gutachter: Dr. R. Hakenbeck
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 7. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

		SEITE
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Biologisches Material	5
2.1.1.	*Ustilago maydis* Stämme	5
2.1.2.	Hefestämme	5
2.1.3.	Bakterienstämme	5
2.1.4.	Pflanzen	5
2.2.	Plasmide und Phagen	6
2.3.	Medien	6
2.3.1.	Kulturmedien für Ustilago maydis	6
2.3.2.	Hefemedien	8
2.3.3.	Bakterienmedien	9
2.4.	Spezielle Chemikalien und sonstige Materialien	11
2.5.	Proteine und Nukleinsäuren	11
2.6.	DNA - Größenstandards	12
2.7.	Puffer und Lösungen	13
2.8.	Analytische Methoden	16
2.8.1.	Bestimmung von DNA Konzentrationen	16
2.8.2.	Agarose Gelelektrophorese	16
2.8.3.	Polyacrylamid Gelelektrophorese	17
2.8.4.	Sequenzierungsgele	17
2.8.5.	Sequenzierung von DNA	19
2.8.6.	Transfer von DNA auf Nitrozellulose	20
2.8.7.	Radioaktive Markierung von DNA mit Hilfe der DNA Pol I aus *E. coli* (Nicktranslation)	21
2.8.8.	Hybridisierung von Filtergebundener DNA mit Radioaktiv markierter DNA	22
2.9.	Präparative Methoden	23
2.9.1.	Präparation doppelsträngiger (ds) RNA aus *U. maydis*	23
2.9.1.1.	Pufferäquilibrierung mit Bentonite	24
2.9.2.	Präparation von *U. maydis* DNA	25
2.9.2.1.	Präparation von Gesamt DNA	25

SEITE

2.9.2.2. Präparation von *U. maydis* mitochondrialer und chromosomaler DNA 25
2.9.3. Präparation von Plasmid DNA aus Hefe 27
2.9.4. Plasmidpräparation aus *E.coli* 28
2.9.4.1. Präparative DNA Isolierung 28
2.9.4.2. DNA Isolierung nach Birnboim et al. (1979) 29
2.9.4.3. Minipräparation von einzelsträngiger M13 DNA 30
2.9.5. Präparative Gelelektrophorese 30
2.9.6. Extraktion wässriger DNA Lösungen mit Phenol 31
2.9.7. Fällen von DNA 31
2.10. Methoden zur *in vitro* Rekombination von Nukleinsäuren 32
2.11. Mikrobiologische und Genetische Methoden 33
2.11.1. Kulturbedingungen für *U. maydis* 33
2.11.2. Keimung von *Ustilago* - Brandsporen 33
2.11.3. Kompatibilitätstest haploider *Ustilago* Stämme (Platemating) 34
2.11.4. Interstrain Inhibition Test von *U. maydis* 34
2.11.5. Infektion von Maispflanzen 34
2.11.6. Kulturbedingungen für Hefe 35
2.11.7. Transformation von spheroplastierten Hefezellen mit Plasmid DNA 35
2.11.8. Transformation von *E.coli* mit Plasmid DNA 36
2.11.9. Test auf α - Komplementation nach Transformation mit M13 mp9 DNA 37
2.11.10. Bestimmung von Zelltitern 38

3. ERGEBNISSE
3.1. Phytopatogenität der *U. maydis* Stämme 32 und 126 und von doppelsträngiger RNA (ds RNA)-freien Derivaten der gleichen Stämme 39
3.2. Experimentelle Strategien zur Entwicklung eines Transformationssystems für *U. maydis* 44
3.2.1. Isolierung von *U. maydis* ARS-Fragmenten 45
3.2.1.1. " Shotgun" - Klonierung von *U. maydis* Gesamt DNA in YIp5 (Hefe - *E.coli* Vector) 46

SEITE

3.2.1.2. Analyse der ARS Aktivität 48

3.2.1.3. Verwandschaft zwischen ARS-Fragmenten aus *U. maydis* 51

3.2.1.4. Zuordnung der DNA Fragmente mit ARS Aktivität zu mitochondrialer oder chromosomaler DNA aus *U. maydis* 54

3.2.1.5. Isolierung von chromosomalen *U. maydis* ARS Sequenzen 56

3.2.1.6. Subklonierung und Sequenzanalyse von verkürzten ARS-Fragmenten aus pURY126#1, pURY32#2 und pURY32#3A 61

3.2.2. Versuche zur Transformation von *U. maydis* 75

3.2.2.1. Protoplastierung und Regeneration von *U. maydis* 76

3.2.2.2. Versuche zur Transformation von *U. maydis* durch Komplementation auxotropher Mutanten 78

3.2.2.3. Versuche zur Transformation von *U. maydis* mit prokaryotischen Resistenzgenen 81

4. DISKUSSION 87

5. LITERATUR 97

6. ZUSAMMENFASSUNG 111

7. ABKÜRZUNGEN 112

1. EINLEITUNG

Zu den phytopathogenen Organismen gehören Bakterien und Pilze wie Spezies der Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* (Verursacher von Naßfäule und Wurzelhalsgallen), *Peronosporaceae*, *Erysiphales* ("falsche und echte Mehltaupilze"), *Uredinales* (Rostpilze) und *Ustilaginales* (Brandpilze). Der wirtschaftliche Schaden, der durch solche Organismen verursacht wird, ist oft erheblich. Um den Schaden gering zu halten, werden resistente Nutzpflanzen gezüchtet und Pestizide eingesetzt. Dem Einsatz chemischer Mittel sind durch die ökologischen Folgen Grenzen gesetzt. Die Züchtung resistenter Kulturpflanzen ist zeitaufwendig und oft sind Ertrag und Resistenz nicht miteinander vereinbar (Peacock und Dennis, 1986). Gezielte Eingriffe zum Schutz der Kulturpflanze und der Umwelt werden eventuell durch ein Verständnis der molekularen Prozesse, die bei Interaktion von Wirtspflanze und phytopathogenem Organismus stattfinden, ermöglicht.

Im Gegensatz zu phytopathogenen Bakterien, wie *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes*, ist der Mechanismus der Pathogenität bei Pilzen molekulargenetisch nicht untersucht.

Voraussetzung für molekulargenetische Untersuchungen der Pathogenität sind unter Laborbedingungen einfach handhabbare und genetisch gut charakterisierte Organismen. Zu den phytopathogenen Organismen, die sich für solche Untersuchungen eignen, gehört *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda (Ramberg und McLaughlin, 1980), der Erreger der Maisbrandkrankheit/Maisbeulenbrand (Flachs, 1953; Krüger, 1984). Systematisch gehört *U.maydis* zur Familie der *Ustilaginaceae* (Ordnung *Ustilaginales*, Klasse Heterobasidiomyceten). Der Pilz ist ein Parasit von *Zea mays* und *Euchlaena mexicana* (Teosinte). Infizierte Pflanzen bilden an oberirdischen Teilen Gallen, die mit schwarzen Brandsporen angefüllt sind.

Drei distinkte Kernphasen werden während des Lebenszyklus von *U.maydis* (Abb. 1) durchlaufen, die diploide, die haploide und die dikaryotische Phase. Diese Phasen schließen Karyogamie, Meiose und Plasmogamie ein.

Die in den Pflanzengallen gebildete diploide Brandspore überwintert im Boden und keimt bei günstigen Bedingungen (Temperatur, Wasser) unter Bildung eines Promyzels aus. Bei der Keimung findet Meiose statt. Von dem Promyzel schnüren sich bei weiteren Zellteilungen haploide Sporidien ab.

U.maydis ist heterothallisch. Die dikaryotische Phase wird durch Fusion von Sporidien unterschiedlichen Kreuzungstyps (Plasmogamie) in meristematischem Pflanzengewebe eingeleitet. Das Fusionsprodukt ist infektiös und durchwächst die Pflanze myzelartig. Die infektiöse Dikaryophase endet mit der Bildung von diploiden Brandsporen (Karyogamie) in dem Gallgewebe der Pflanze. Bis auf die Brandsporenbildung sind alle Entwicklungsstadien von *U.maydis* außerhalb der Pflanze auf geeigneten Nährmedien und mit Hilfe genetischer Selektionsmethoden nachvollziehbar (Holliday, 1961a; Holliday, 1961b; Puhalla, 1968; Day und Anagnostakis, 1971). Genetische Untersuchungen zur Phytopathogenität von *U.maydis* wurden möglich, nachdem die Heterothallie (Stakman und Christensen, 1927) und die daran beteiligten Inkompatibilitätsfaktoren bekannt waren.

Die Fusion haploider Sporidien und die Ausbildung eines infektiösen Myzels wird durch die Inkompatibilitätsloci a und b kontrolliert. Der Inkompatibilitätslocus a liegt in zwei Allelen, a1 und a2 vor, während für den Inkompatibilitätslocus b mehr als 15 Allele bekannt sind (Hanna, 1929; Christensen, 1931; Rowell und De Vay, 1954; Rowell, 1955; Holliday, 1961a; Holliday, 1961b; Puhalla, 1968; Puhalla, 1970). Diese werden mit b_A-b_R bezeichnet.

Paarung erfolgt nur zwischen Stämmen mit unterschiedlichen Allelen in beiden Inkompatibilitätsloci (z.B. $a1b_A \times a2b_B$). Die Loci a und b sind nicht gekoppelt. Sie werden bei Keimung der diploiden Brandspore während der Meiose auf die F1-Generation verteilt.

Verteilung der a- und b-Allele nach einer Kreuzung zweier haploider, kompatibler *U.maydis* Stämme in der F1-Generation

$$a1b_A \quad x \quad a2b_B$$

$$a1b_A \quad a1b_B \quad a2b_B \quad a2b_A \qquad F_1$$

Die Inkompatibilitätsallele des a-Locus kontrollieren die Fusion haploider Sporidien. Die Bildung eines infektiösen Dikaryons unterbleibt, wenn Stämme mit gleichem a-Allel und unterschiedlichen b-Allelen gekreuzt werden. Der b-Locus ist für die Ausprägung der Phytopathogenität verantwortlich.

Bei der Brandsporenkeimung können unvollständige meiotische Produkte, homothallische diploide *U.maydis* Stämme entstehen. Diese Stämme sind entweder solopathogen (heterozygot a / heterozygot b; homozygot a / heterozygot b) oder nicht infektiös (homozygot a / homozygot b; heterozygot a / homozygot b) (Holliday, 1961b; Puhalla, 1968).

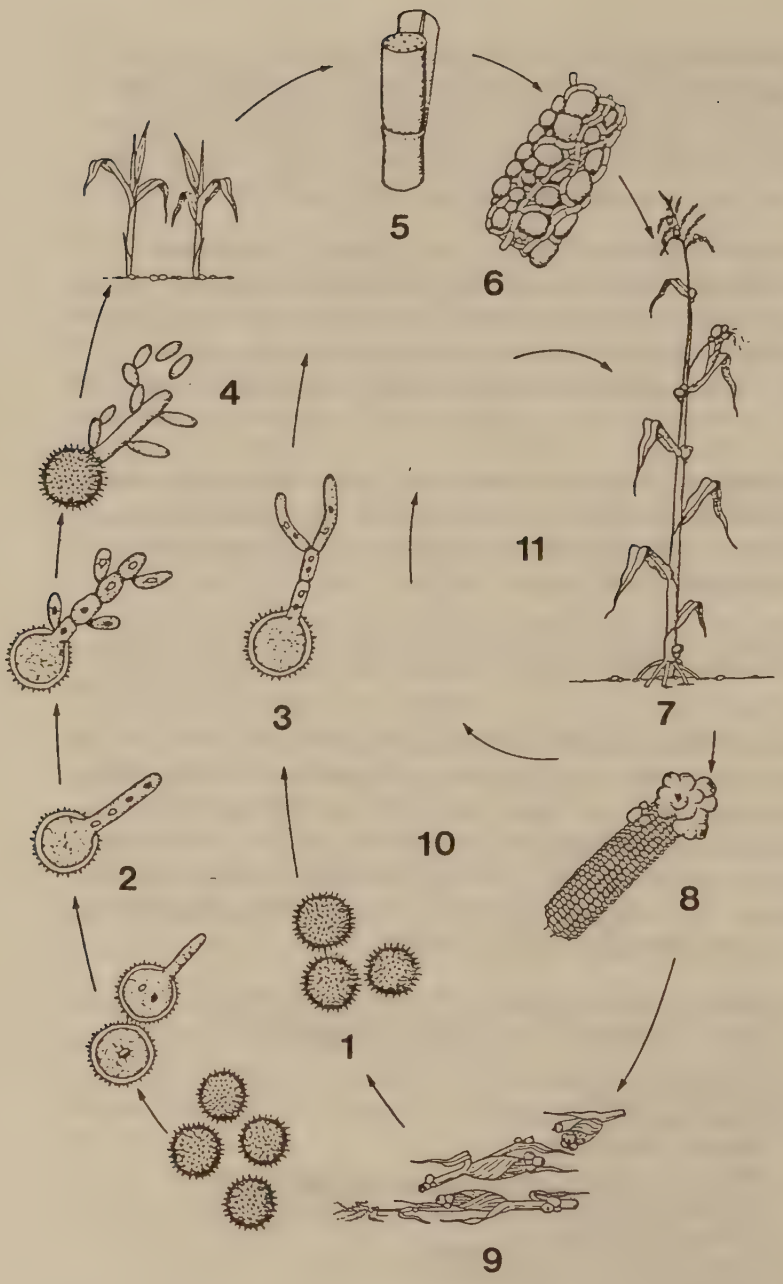
Aus genetischen Analysen zur Wirkung des Inkompatibilitätslocus b ist bekannt, daß die b-Allele nicht nur die infektiöse Phase, sondern die sich anschließende Entwicklung bis zur Sporidienbildung beeinflussen (Day et al., 1971).

Die durch *U.maydis* induzierte Gallbildung der Maispflanzen und der damit verknüpfte vollständige und kontrollierte Ablauf des Entwicklungszyklus von *U.maydis* erfordert die Kombination von zwei intakten, natürlich vorkommenden b-Allelen (Holliday, 1974). Dem b-Locus kommt damit eine zentrale Rolle bei der Phytopathogenität von *U.maydis* zu. Da der b-Locus für die Ausprägung der Phytopathogenität heterozygot vorliegen muß, bietet es sich an, diesen Zustand künstlich, d.h. durch Einbringen eines klonierten b-Allels in eine haploide Sporidie, zu erzeugen. Möglicherweise sind solche Sporidien solopathogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Entwicklung eines Transformationssystems für *U.maydis* durchgeführt.

Abb. 1: Lebenszyklus von *U.maydis*
1. Reife Brandsporen
2. Auswachsendes Promyzel
3. Keimende Brandsporen
4. Abgeschnürte Sporidien
5. Meristematisches Gewebe in Knotenbereichen und an der Basis infizierter Pflanzen
6. Bildung von Brandsporen
7. Gallen an ausgewachsenen Pflanzen
8. Maisbrand Gallen an Maiskolben
9. Brandsporen in Pflanzenresten am Boden
10. Primärkreislauf
11. Sekundärkreislauf

UNIV. LEIDEN BIBL.



Verändert nach Roberts und Boothroyd (1975)

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Biologisches Material

2.1.1 *Ustilago maydis* Stämme

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz	Herkunft
22903	a2bF, P1 (KP1, VLP's), haploid	Puhalla, 1970	ATCC
32	a2bn, haploid		Laborsammlung
126	a1bn, haploid		Laborsammlung

2.1.2 Hefestämme

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Herkunft
Y220	α, ura3-52, leu2, trp1, his4, cir^+	P. Philippsen

2.1.3 Bakterienstämme

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz	Herkunft
HB101	recA, pro, leu, thi	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)	U. Günthert
DH5	F^-, endA1, hsdR17 (rK^-, mK^+), supE44, thi-1, λ^-, recA1, gyrA96, relA1	Hanahan (1985)	E. Subramanian
JM103	Δlac, pro, thi, strA, F'traD36, ProAB, $lacI^Q$, ZΔM15		Biolabs

2.1.4 Pflanzen

Zuckermais der Sorte "Golden Bantam".

2.2 Plasmide und Phagen

Plasmide

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften in *E.coli*/Hefe	Referenz
pBR322	Ap^r, Tc^r	Bolivar et al. (1977)
YIp5	Ap^r, Tc^r/URA-3	Scherer und Davis (1979)
Yep24	Ap^r, Tc^r/URA-3 (2-µm origin)	Fasiolo et al. (1981)
pMP81	Kan^r/LEU-2 (2-µm origin)	Hollenberg (1979)
pMP78-1	Cm^r, Ap^r/LEU-2, (2-µm origin)	Hollenberg (1979)
YRp7	Ap^r, Tc^r/TRP1, (ARS 1)	Stinchcomb et al. (1979)
pURY1	Ap^r, Tc^r/URA-3 (ARS *U.maydis*)	Banks (1983a)
pURY2	Ap^r, Tc^r/URA-3 (ARS *U.maydis*)	Banks (1983a)
pURY19-6	Ap^r, Tc^r/URA-3 (ARS *U.maydis*)	Banks (1983a)
pSV2neo	Ap^r, Kan^r (APH(3')II)	Southern und Berg (1982)
pUC-4K	Ap^r, Kan^r (APH(3')I)	Vieira und Messing (1982)

Phagen

Bezeichnung	Referenz	Herkunft
M13mp9	Messing und Vieira (1982)	Laborsammlung
M13mp8	Messing und Vieira (1982)	Laborsammlung

2.3 Medien

2.3.1 Kulturmedien für *U.maydis*

Vitaminlösung für *Ustilago* Vollmedium (VM) (Beadle und Tatum, 1945).

100 mg Thiamin
20 mg Kalziumpanthotenat
50 mg p-Aminobenzoesäure
20 mg Nikotinsäure
20 mg Cholinchlorid
40 mg myo-Inositol
50 mg Pyridoxin
50 mg Folsäure
50 mg Riboflavin
1 l H_2O

Salzlösung für *Ustilago* VM (Holliday, 1961a)

12 g NH_4NO_3
8 g KH_2PO_4
2 g Na_2SO_4
4 g KCl
1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
500 mg $CaCl_2 \cdot 7H_2O$
4 ml Spurenelemente für *Ustilago* VM
auf 1 l mit H_2O auffüllen

Spurenelemente für *Ustilago* VM (Holliday, 1961a)

60 mg H_3BO_3
191 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
400 mg $ZnCl_2$
47 mg $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$
100 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
400 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
1 l H_2O

Nukleinsäurehydrolysat für *Ustilago* VM (Pontecorvo et al., 1953). 2 g Kalbsthymus DNA wurden in 15 ml 1N HCl, 2 g Hefe-RNA in 15 ml 1N NaOH gelöst. Beide Lösungen wurden im Wasserbad für 20 Min. auf 100°C erhitzt, zusammengegeben, der pH-Wert auf 6.0 eingestellt und die Lösung heiß filtriert. Mit sterilem H_2O dest wurde auf ein Endvolumen von 40 ml aufgefüllt.

VM-Platten (verändert nach Holliday, 1961a, 1974).

10 g Glucose
2 g Caseinhydrolysat
1 g Hefeextrakt
10 ml Vitaminlösung
250 ml Salzlösung
5 ml Nukleinsäurehydrolysat
20 g Bacto Agar

Der pH-Wert wurde auf 5.2 eingestellt und dann mit H_2O auf 1 l aufgefüllt.

Platemating-Platten (Puhalla, 1968)

20 g Glucose
10 g Caseinhydrolysat
2 g Hefeextrakt
20 ml Vitaminlösung (*Ustilago* VM)
500 ml Salzlösung (*Ustilago* VM)
10 ml Nukleinsäurehydrolysat (*Ustilago* VM)
20 g Bacto-Agar
auf 1 l mit H_2O auffüllen

Interstrain-Inhibition-Platten (Puhalla, 1968)

20 g Glucose
10 g Caseinhydrolysat
2 g Hefeextrakt
20 ml Vitaminlösung
500 ml Salzlösung
10 ml Nukleinsäurehydrolysat
5 g Natriumglutamat
20 g Bacto-Agar
auf 1 l mit H_2O auffüllen

Minimalmedium (MM) (Holliday, 1974)

10 g Glucose
250 ml Salzlösung (*Ustilago* VM)
3 g KNO_3

Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt und dann mit H_2O auf 1 l aufgefüllt.

Minimalmedium-Platten wurden aus MM durch zusätzliche Zugabe von 20 g Bacto-Agar / 1 l hergestellt (MM-Platten).

Minimalmedium- und Vollmediumregenerationsagar wurden aus MM oder VM durch Zugabe von 214 g/l Sorbitol und 10 g/l Bacto-Agar hergestellt (MM- und VM-Regenerationsagar).

Zusätze zum Minimalmedium

Steril filtrierte Lösungen von Aminosäuren, Vitaminen und Nukleinsäurebasen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren hinzugefügt, Aminosäuren mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Purine und Pyrimidine 10 µg/ml und Vitamine 1 µg/ml (Holliday, 1961a).

NSY-Medium (Lippincott, 1965)

8 g Nutrient broth
5 g Sucrose
1 g Hefeextrakt
1 l H_2O

2.3.2 Hefemedien (Sherman et al., 1979)

YPD Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Glucose
20 g Bacto-Agar
1 l H_2O

YNB-Medium

67 g Hefe Stickstoffquelle ohne Aminosäuren
(Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)

20 g Glucose
1 ml YPD
1 l H_2O

YPD-und YNB-Platten wurden aus YPD- und YNB-Medium durch Zugabe von 20 g/l Bacto-Agar hergestellt.

YPD- und YNB-Regenerationsagar wurde aus YPD- und YNB-Medium durch Zugabe von 182 g/l Sorbitol und 10 g/l Bacto-Agar hergestellt.

Aminosäure-Zugaben

Dem YNB-Medium wurde nach dem Autoklavieren steril filtrierte Lösungen der entsprechenden Aminosäuren zugesetzt.

Leucin	30 µg/ml
Uracil	20 µg/ml
Histidin	20 µg/ml
Tryptophan	20 µg/ml

Die Konzentrationsangaben bezeichnen Endkonzentrationen.

2.3.3 Bakterienmedien

dYT-Medium (Miller, 1972)

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1 l H_2O

M9CAA-Medium

100 ml 10 x M9 Salze
5 g Casamino Acids
900 ml H_2O

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium hinzugefügt:
2 ml 1 M $MgSO_4$
1 ml 0.1 M $CaCl_2$
10 ml 20 % (w/v) Glucose
1 ml 2 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid

Antibiotikahaltige Medien

Den Medien wurden nach dem Autoklavieren steril filtrierte Lösungen der entsprechenden Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin 60 µg/ml

Kanamycin 75 µg/ml

Tetracyclin 20 µg/ml

Die Konzentrationsangaben bezeichnen Endkonzentrationen.

10 x M9-Salze

150 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$
30 g/l KH_2PO_4
10 g/l NH_4Cl

YT-Platten

8 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar
1 l H_2O

M9 Platten

100 ml 10 x M9 Salze
15 g Agar
900 ml H_2O

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium hinzugefügt:
1 ml 1 M $MgSO_4$
1 ml 0.1 M $CaCl_2$

Falls zur Selektion erforderlich, wurden zusätzlich hinzugefügt:

Vitamine: Thiaminhydrochlorid 2 µg/ml (Endkonzentration)

Zucker: Glukose 0.2 % (w/v) (Endkonzentration)

Aminosäuren: Jeweils 40 µg/ml (Endkonzentration)

Weichagar

8 g Nutrient broth
5 g NaCl
6.5 g Agar
1 l H_2O

2.4 Spezielle Chemikalien und sonstige Materialien

Spezielle Chemikalien

Agarose	FMC Corporation
Bentonite	Sigma
Bisbenzimide (Hoechst 33258)	Sigma
Cholinchlorid	Sigma
Desoxyribonukleotid-Triphosphate: dATP, dGTP, dTTP, dCTP	Biolabs
Didesoxyribonukleotid Triphosphate ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP	Biolabs, Amersham
[α^{35}S]dATPαS	Amersham
[α^{32}P]dATPαP, [α^{32}P]dCTPαP	Amersham
Geneticin (G418)	Sigma
Myo-Inositol	Sigma
Yeast Nitrogen Base ^{W}/o amino acids	Difco

Sonstiges Material

Dialyseschläuche	Union Carbide
Elutip-d-Säulen	Schleicher & Schüll
Kleinbildfilme	Ilford
Land-Film	Polaroid
Millipore Filter	Millipore
Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schüll
Röntgenfilm: XAR5	Kodak

2.5 Proteine und Nukleinsäuren

Proteine

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer
ß-Glucuronidase (aus Helix pomatia)	Sigma
Cellulose "Onozuka R-10" (aus Trichoderma viride)	Serva
DNase I (aus Rinderpankreas)	Boehringer
E.coli Polymerase I (Klenow Fragment)	Boehringer
Lysozym	Boehringer
Novozym 234	Novo Industri A/S
Proteinase K (aus Tritirachium album)	Boehringer
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
Rinderserum Albumin	Sigma
Sulfatase (aus Helix pomatia)	Sigma

T4 DNA Ligase — Boehringer

Zymolase 20T (aus Arthrobacter luteus) — Seikagaku Kogyo Co.

Restriktionsendonukleasen (Roberts, 1983)

	Mikroorganismus	Erkennungssequenz	Inkubationsbedingungen
AccI	Acinetobacter calcoaceticus	5' GT$^{\downarrow A}/_{C}$ $^{G}/_{T}$ AC 3'	med-RE
AhaIII	Aphanothece halophytica	5' TTT$^{\downarrow}$AAA 3'	high-RE
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens H	5' G$^{\downarrow}$GATCC 3'	high-RE
BstEII	Bacillus stearothermophilus ET	5' G$^{\downarrow}$GTNACC 3'	high-RE
EcoRI	Escherichia coli BS5	5' G$^{\downarrow}$ATTC 3'	high-RE
HaeIII	Haemophilus aegyptius	5' GG$^{\downarrow}$CC 3'	low-RE
HincII	Haemophilus influencae	5' GTPy$^{\downarrow}$puAC 3'	med-RE
HindIII	Haemophilus influencae	5' A$^{\downarrow}$AGCTT 3'	high-RE
HinfI	Haemophilus influencae R_f	5' G$^{\downarrow}$ANTC 3'	high-RE
HpaII	Haemophilus parainfluencae	5' C$^{\downarrow}$CGG 3'	low-RE
MspI	Moraxella species	5' C$^{\downarrow}$CGG 3'	low-RE
PstI	Providencia stuartii 164	5' CTGCA$^{\downarrow}$G 3'	high-RE
SalI	Streptomyces albus G	5' G$^{\downarrow}$TCGAC 3'	high-RE
SspI	Serratia species SA1	5' AAT$^{\downarrow}$ATT 3'	high-RE
TaqI	Thermus aquaticus YT1	5' T$^{\downarrow}$CGA 3'	high-RE

Nukleinsäuren

DNA (aus Kalbsthymus)	Sigma
DNA (aus Heringssperma)	Sigma
RNA (aus Hefe)	Boehringer
Sequenzierungsprimer d(GTAAAACGACGGCCAGT)	Biolabs

2.6 DNA-Größenstandards (Laborpräparate)

λ-DNA HindIII Fragmente:

23130 bp
9419 bp
6557 bp
4371 bp
2322 bp
2028 bp
564 bp
125 bp

λ-DNA HindIII-EcoRI Fragmente:

21226 bp	1914 bp
5148 bp	1584 bp
4973 bp	1330 bp
4217 bp	983 bp
3530 bp	831 bp
2027 bp	564 bp

λ-DNA BstEII Fragmente:	8454 bp	1929 bp	
	7242 bp	1371 bp	
	6369 bp	1264 bp	
	5686 bp	702 bp	
	4822 bp	224 bp	
	4324 bp	117 bp	
	3675 bp		
	2323 bp		
λ-DNA PstI Fragmente:	11509 bp	1700 bp	249 bp
	5077 bp	1159 bp	216 bp
	4749 bp	1093 bp	211 bp
	4507 bp	805 bp	200 bp
	2838 bp	514 bp	164 bp
	2560 bp	468 bp	150 bp
	2459 bp	458 bp	94 bp
	2443 bp	339 bp	87 bp
	2130 bp	264 bp	72 bp
			15 bp
pBR322-DNA HaeIII Fragmente:	587 bp	124 bp	
	540 bp	123 bp	
	504 bp	104 bp	
	458 bp	89 bp	
	434 bp	80 bp	
	267 bp	64 bp	
	234 bp	57 bp	
	213 bp	51 bp	
	192 bp	21 bp	
	184 bp	18 bp	
		11 bp	
		7 bp	

Im Text verwendete Größenangaben in kb geben annähernde, über Restriktionsverdau ermittelte Fragmentgrößen wieder. Größenangaben in bp werden nur für sequenzierte Fragmente verwendet.

2.7 Puffer und Lösungen

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.9 1 mM Na_2EDTA
E-Puffer (Elektrophoresepuffer)	40 mM Tris-Acetat, pH 7.9 2 mM Na_2EDTA
TBE-Puffer (Elektrophoresepuffer)	100 mM Tris-H_3BO_3, pH 7.9 2 mM Na_2EDTA
Phenol	dest. Phenol wird mit 0.18 % (w/v) Hydroxychinolin versetzt und mit 0.5 M Tris-HCl, pH 7.9, äquilibriert
10 x low RE (Restriktionspuffer)	100 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM $MgSO_4$ 10 mM DTT

10 x med RE (Restriktionspuffer)	100 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM $MgSO_4$ 10 mM DTT 500 mM NaCl
10 x high RE (Restriktionspuffer)	1000 mM NaCl 500 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM $MgSO_4$
10 x NT-Puffer (Nicktranslationspuffer)	500 mM Tris-HCl, pH 7.2 100 mM $MgSO_4$ 1 mM DTT 500 g/l BSA
10 x LP (Ligasepuffer)	100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM $MgCl_2$ 100 mM DTT 6 mM ATP
10 x Sequenzierungspuffer	500 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM $MgCl_2$ 10 mM DTT
Stoplösung	0.3 % (w/v) Xylen-Cyanol 0.3 % (w/v) Bromphenolblau 0.3 % (w/v) Na_2EDTA in Formamid
DNA-Probenpuffer	50 % (w/v) Sucrose 0.25 % (w/v) Bromphenolblau in E-Puffer
Plasmid 1-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 25 % (w/v) Sucrose
Plasmid 2-Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 8.0 250 mM Na_2EDTA
Plasmid 3-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM Na_2EDTA 2 % (w/v) Triton X-100
Lyse-Gemisch	10 mM Tris 1 mM Na_2EDTA 1 % (w/v) SDS mit 5 M NaOH pH 12.55 einstellen
Minilysat Lösung I	25 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM Na_2EDTA 1 % (w/v) Glukose 2 mg/ml Lysozym
Minilysat Lösung II	1 % (w/v) SDS 0.2 M NaOH

Minilysat Lösung III	3 M $NaCH_3COO$, pH 4.8 mit Eisessig einstellen
Minilysat Lösung IV	100 mM $NaCH_3COO$ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Low Salt Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 mM Na_2EDTA 200 mM NaCl
High Salt Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 mM Na_2EDTA 1000 mM NaCl
Sucrose Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 10 mM Na_2EDTA 500 mM Sucrose
Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 50 mM Na_2EDTA 500 mM NaCl 2 % (w/v) SDS
Phosphat-Puffer	1 M Na_2HPO_4 1 M NaH_2PO_4 mit NaOH auf pH 6.8 eingestellt
20 x SSPE	174 g NaCl 27.6 g NaH_2PO_4 7.4 g Na_2EDTA mit H_2O dest. auf 1 l aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt
100 x Denhardt's Lösung	20 g Ficoll 20 g Polyvinylpyrrolidon 20 g Rinderserumalbumin 1 l H_2O
20 x SSC	175.3 g NaCl 88.2 g Na-Citrat mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und mit 10 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt
20 % PEG-Lösung	20 % (w/v) PEG 6000 10 mM $CaCl_2$ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
ds RNA-Puffer	250 mM Sucrose 3 mM Na_2EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 7.2
1 M KPO_4, pH 7.5	2 Volumenanteile 1 M K_2HPO_4 1 Volumenanteil 1 M KH_2PO_4 miteinander mischen

P-Puffer (Spheroplastierungs-puffer)	100 ml 1 M KPO_4, pH 7.5 900 ml 1.1 M Sorbitol
STC-Puffer	1000 mM Sorbitol 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM $CaCl_2$
SEC-Puffer	1200 mM Sorbitol 10 mM Na_2EDTA 100 mM Na-Citrat mit H_2O auf 1 l auffüllen und mit 5 N NaOH auf pH 5.8 einstellen

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Bestimmung von DNA Konzentrationen

Die DNA Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) in einem Zeiss Spektralphotometer gemessen. Für die Berechnung der DNA Konzentration gilt:

$$1\ A_{260}\ /\ ml \triangleq 50\ \mu g/ml$$

Für reine DNA gilt:

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.8$$

2.8.2 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Analyse von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurde auf Agarosegelen in vertikalen Plattengelapparaturen oder horizontalen Flachgelapparaturen durchgeführt. Die Agarose-Konzentration betrug je nach Experiment zwischen 0.7 % (w/v) und 2 % (w/v).

Agarose wurde in E-Puffer durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst, auf 60°C abgekühlt und in die jeweilige Apparatur gegossen. Nach dem Gelieren der Agarose wurden die Gelkammern mit E-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstantem Strom (75 mA). Die Dauer der Elektrophorese richtete sich

nach der Größe der aufzutrennenden DNA Moleküle. Das Gel wurde anschließend für 10 Min. in einer EtBr-Lösung (0.5 µg/ml) gefärbt. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) mit einer Polaroid Kamera (Filmtyp P/N 55, Kodak Orangefilter Wratten No. 21) fotografiert.

2.8.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Doppelsträngige RNA und DNA Fragmente < 500 bp wurden auf Polyacrylamid Gelen (20 cm x 20 cm x 0.15 cm) in vertikalen Gelapparaturen aufgetrennt. Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

6 % (w/v) Acrylamid
0.2 % (w/v) Bisacrylamid
0.1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
0.05 % (v/v) TEMED
in E-Puffer

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat gestartet. Nach beendeter Polymerisation (∿ 60 Min.) wurden die Gele in die Apparatur eingesetzt und die Gelkammern mit E-Puffer gefüllt.

Zur Herstellung von gemischten Agarose-Acrylamid Gelen (3 % Acrylamid; 0.7 % Agarose) wurde eine 6%ige Acrylamid-Gellösung (s.o.) im Verhältnis 1:1 mit einer 70°C warmen Agarose-Lösung (1.4 % (w/v) in E-Puffer) gemischt und sofort zwischen die Glasplatten gegossen.

Die Elektrophorese von Polyacrylamid- und gemischten Gelen erfolgte bei konstanter Spannung (100 V) für etwa 2 Stunden. Die Färbung der Gele erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben.

2.8.4 Sequenzierungsgele

Die in den Sequenzierungsreaktionen entstandenen einzelsträngigen DNA Fragmente wurden auf 0.2 mm dicken, denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen analysiert (Garoff et al., 1981). Das Gelsystem hatte folgende Zusammensetzung:

6 % (w/v) Acrylamid
0.3 % (w/v) Bisacrylamid
7 M Harnstoff
0.05 % (v/v) TEMED
0.1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
in TBE-Puffer

Für ein 8 %iges Gel wurde die Acrylamidkonzentration auf 8 % (w/v) und die Bisacrylamidkonzentration auf 0.4 % (w/v) erhöht.

Zur Herstellung der Gellösung wurden Acrylamid, Bisacrylamid, Harnstoff und TBE-Puffer bei 37°C in einem Becherglas bis zum vollständigen Lösen des Harnstoffes gerührt. Dann wurde das Volumen eingestellt, die Lösung filtriert (Whatman No. 1) und auf Eis gestellt. Durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Die Gellösung wurde auf eine vorbereitete rechteckige Glasplatte gegossen und die Ohrenplatte langsam von unten nach oben über die rechteckige Platte geschoben. Hierbei verteilt sich die Lösung zwischen den Platten, ohne daß Luftblasen entstehen. Der Kamm wurde eingesetzt und die Platten an den Ecken geklammert. Nach 30 Min. Polymerisation konnte das Gel benutzt werden.

Die rechteckige Platte wurde silanisiert. Dazu wurde Silan GF31-Lösung (5 ml Ethanol, 0.15 ml 10 % (w/v) Essigsäure, 15 µl Silan GF31) gleichmäßig auf der Platte verteilt und 30 Min. bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden die Platten mit absolutem Ethanol gereinigt und poliert. 0.2 mm dicke Teflon-Spacer wurden auf die beschichtete Seite der Platten gelegt und auf der Rückseite festgeklebt. Die Ohrenplatten wurden silikonisiert. Dazu wurden 3 ml Silikon-Lösung (1 % (v/v) Dichlordimethylsilan in CCl_4) auf der Platte gleichmäßig verteilt.

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelapparaturen mit TBE-Puffer. Nach dem Einsetzen des Gels in die Gelapparatur wurden die Pufferreservoire gefüllt, der Kamm gezogen und die Auftragsschlitze mehrmals mit TBE-Puffer gespült. 1 µl der jeweiligen Probe wurde mit einer geeichten Glaskapillare aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 2000 V für 1-2 Stunden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Ohrenplatte abgenommen und das Gel auf der Glasplatte für 15 Min. in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Danach wurde es unter fließendem Wasser gewaschen, mit fusselfreiem Papier abgetupft und 2 Stunden bei 60°C getrocknet. Die Glasplatte mit dem getrockneten Gel wurde zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak XAR-5) in eine Kassette

gelegt und mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Die Röntgenfilme wurden 1 Min. in Kodak Lx24 entwickelt und nach Zwischenwässerung, Fixieren und Schlußwässerung getrocknet.

2.8.5 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzen wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1981) bestimmt. Einzelstrang-DNA von rekombinanten M13mp9-Klonen wurde wie unter 2.9.4.3 beschrieben präpariert.

Zur Herstellung des Substrates für die Verlängerungsreaktionen wurde die einzelsträngige DNA mit einem 17 Nukleotide langen Sequenzierungsprimer (Biolabs) hybridisiert. Der Hybridisierungsansatz bestand aus:

3 µl H_2O
1 µl 10 x Sequenzierungspuffer
5 µl Einzelstrang DNA (0.05 µg/ml)
1 µl M13 Oligonukleotid Primer (2.5 µg/ml)

Der Ansatz wurde 3 Min. auf 100°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und dann für 2 Stunden bei 58°C inkubiert (Matrize).

Mit jeder Matrize wurden 4 verschiedene Sequenzreaktionen, mit jeweils einem der 4 Dideoxynukleotide durchgeführt. Dazu wurden dem Hybridisierungsansatz 1.5 µl (15 µCi)[α-^{35}S]dATPαS (> 600 Ci/mmol) und 1.0 µl Klenow Fragment (2 U/µl) (Klenow, 1970) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde auf 4 Reaktionsgefäße verteilt. An den Rand jedes Reaktionsgefäßes wurden je 2 µl der entsprechenden dNTP/ddNTP Mischung (A-Mix; T-Mix; C-Mix; G-Mix)(s.u.) pipettiert. Diese Mischungen hatten folgende Zusammensetzung:

	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
ddATP (µM)	60	-	-	-
ddCTP (µM)	-	150	-	-
ddGTP (µM)	-	-	150	-
ddTTP (µM)	-	-	-	150
dATP (µM)	1.7	1.7	1.7	1.7
dCTP (µM)	30	4.2	40	40
dGTP (µM)	30	40	4.2	40
dTTP (µM)	30	40	40	1.7
NaCl (mM)	50	50	50	50
MgCl (mM)	10	10	10	10
Tris-HCl pH 7.5 (mM)	10	10	10	10
DTT (mM)	1	1	1	1

Der Start der Reaktion erfolgte durch kurzes Zentrifugieren der Proben. Die Proben wurden für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl Chase-Mischung (0.25 mM dATP; 0.25 mM dCTP; 0.25 mM dGTP; 0.25 mM dTTP) zu jeder Reaktion und Fortsetzung der Inkubation für 15 Min. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6 µl Stoplösung beendet. Die Proben wurden eingefroren (-20°C). Vor der Analyse der Reaktionsprodukte auf Sequenziergelen wurden die Proben für 1 Min. auf 100°C erhitzt und danach auf Eis gestellt.

2.8.6 Transfer von DNA auf Nitrocellulose (Southern, 1975)

Die in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde zur Vorbereitung des Transfers im Gel denaturiert. Dazu wurde das Gel zweimal für 15 Min. bei Raumtemperatur in je 400 ml 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl sanft hin- und herbewegt. Danach wurde das Gel für zweimal 15 Min. in je 500 ml 0.5 M Tris pH 8.0, 1.5 M NaCl bei Raumtemperatur neutralisiert. Unter diesen Bedingungen bleibt die DNA einzelsträngig. Das so behandelte Gel wurde kurz in H_2O gespült. Das Gel wurde auf ein, in ein Reservoir von 20 x SSPE hängendes, Whatman 3MM-Filterpapier gelegt.

Ein auf die Maße des Gels zurechtgeschnittenes Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell) wurde in 2 x SSPE kurz eingeweicht und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Auf die Transfermembran wurden zwei Lagen in 2 x SSPE geweichtes, um 1 mm kleiner als das Filter zurechtgeschnittenes Whatman 3MM Papier gelegt und darüber drei Lagen trockenes Whatman 3MM-Papier. Darauf wurden 20 - 30 Lagen saugfähiges Küchenpapier in Gelgröße gestapelt und mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert.

Das trockene Papier saugt 20 x SSPE aus dem Reservoir durch das Gel und die Transfermembran. Dabei wird die denaturierte DNA aus dem Gel in das Filter gezogen und bindet dort. Der Transfer dauert je nach DNA-Fragmentgröße 5 - 15 Stunden. Die Transfermembran wurde anschließend kurz in 2 x SSPE getaucht und auf Filterpapier an der Luft vorgetrocknet. Die transferierte DNA wurde im Vakuumofen bei 80°C für 2 Stunden in das Filter "eingebacken". Die getrockneten Filter wurden in Aluminiumfolie verpackt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.8.7 Radioaktive Markierung von DNA mit Hilfe der DNA Polymerase I aus *E.coli* (Nicktranslation) (Rigby et al., 1977)

Zur radioaktiven Markierung von DNA Restriktionsfragmenten, die über eine präparative Gelelektrophorese (siehe 2.9.5) isoliert und gereinigt worden sind, wurde folgender 50 µl Ansatz hergestellt: 25 µCi [α-^{32}P]dATP oder [α-^{32}P]dGTP oder [α-^{32}P]dCTP (jedes mit 3000 Ci/mM, 8.3 pMol/25 µCi), 1 µg Fragment-DNA (zwischen 0.4 und 5 pMol), je 400 nMol der im Reaktionsansatz fehlenden "kalten" Nukleotide. 5 µl 10 x NT-Puffer, 1 µl DNase I (50 ng/ml) und 5 units DNA Polymerase I aus *E.coli* (Kornberg-Enzym). Der Ansatz wurde 60 Min. lang bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA pH 8.5. Danach wurde der gesamte Ansatz durch Zugabe von 48 µl H_2O dest. auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und mit 5 µl 4 M NaCl auf eine Endkonzentration von 0.2 M NaCl gebracht. Die Trennung der radioaktiv markierten Fragmente von noch vorhandenen freien Nukleotiden erfolgte über kleine Ionenaustauschersäulen (Elutip-d Säulen, siehe 2.9.3). Die Radioaktivität eines Aliquots wurde in einem LKB-Szintillationszähler gemessen und darüber die Einbaurate von [α-^{32}P]dCTP oder [α-^{32}P]dGTP oder [α-^{32}P]dATP bestimmt. 2.2 x 10^{12} dpm entsprechen einem Curie (Cooper, 1982). Das übrige Eluat wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.8.8 Hybridisierung von filtergebundener DNA mit radioaktiv markierter DNA (Blin et al., 1976)

Zur Hybridisierung filtergebundener DNA mit radioaktiv markierter DNA wurden die Filter wie folgt vorbehandelt: Pro cm^2 Filterfläche wurden ca. 100-200 µl folgender Vorhybridisierungslösung angesetzt: 50 % (v/v) Formamid dest., 5 x SSPE, 5 x Denhardt's Lösung, 10 µl/ml sonifizierte Kalbsthymus-DNA (10 mg/ml) und 0.3 % (w/v) SDS. Durch den hohen Anteil an Formamid in der Lösung wird die Renaturierung der DNA während der Inkubation verhindert, da das Formamid zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes von doppelsträngiger DNA führt (McConaughy et al., 1969; Casey et al., 1977). Der Filter wurde mit der Vorhybridisierungslösung

in PVC-Folie luftblasenfrei eingeschweißt und dann für 2 - 4 Stunden bei 42°C unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurde eine Kantenseite der PVC-Folie aufgeschnitten und die Vorhybridisierungslösung mit Hilfe eines Glasstabes, der über die Tasche gerollt wurde, entfernt.

Für die Hybridisierung der radioaktiv markierten DNA Fragmente wurde eine Lösung von der gleichen Zusammensetzung und gleicher Menge pro Filterfläche wie bei der Vorhybridisierungslösung hergestellt. Es wurde 1 ml abgenommen und in einem Heizblock für 10 Min. auf 96°C erhitzt. Ebenso wurde mit der [α-^{32}P]markierten DNA verfahren. Beide Lösungen wurden gemischt und in die PVC-Folientasche mit dem Filter gegeben, in die vorher die restliche Hybridisierungslösung eingefüllt worden war. Auftretende Luftblasen wurden vorsichtig herausgedrückt. Die PVC-Tasche wurde mit einem Folienschweißgerät so zugeschweißt, daß die Tasche ca. 5 mm größer war, als der eingeschweißte Filter. Um eine Kontamination des Wasserbads mit Radioaktivität zu verhindern, wurde die Hybridisierungstasche noch in zwei weitere feste PVC-Folien eingeschweißt (Sicherheitstasche). Zur Hybridisierung wurde der Filter bei 42°C für 12 - 24 Stunden unter leichem Schütteln im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurde der Filter unter moderaten oder stringenten Bedingungen gewaschen. Die moderate Behandlung beinhaltete viermaliges Waschen bei 42°C für je 20 Min. mit 2 x SSPE, 0.1 % SDS. Die stringenten Waschvorgänge erfolgten bei 42°C für 20 Min. mit 2 x SSPE, 0.1 % SDS, für 2 Stunden mit 0.1 x SSPE, 0.1 % SDS und 30 Min. mit 0.1 x SSPE, 0.1 % SDS. Der so behandelte Filter wurde auf Whatman 3MM Papier abgetupft und bei 60°C vollständig getrocknet.

Der Filter wurde an den Ecken mit Doppelklebeband in einer Siemens Röntgenfilmkassette fixiert und mit Saranfolie abgedeckt. Zwei Röntgenfilme und eine Verstärkerfolie wurden über den Film gelegt (Dupont Cronex Lightning plus BA) und die Kassette wurde verschlossen. Die Röntgenfilme wurden zu unterschiedlichen Zeiten von dem Filter abgenommen und entwickelt (1 Min. Kodak Schnellentwicklerbad), 5 Min. Fixierung (Dupont Cronex TF),

20 - 30 Min. Wässerung. Anschließend wurden die Filme an der Luft getrocknet.

2.9 Präparative Methoden

2.9.1 Präparation doppelsträngiger (ds)RNA aus *U.maydis* (Vodkin et al., 1974)

Eine 300 ml Kultur logarithmisch wachsender *U.maydis* Zellen wurden durch Zentrifugation (40 Min. bei 4000 rpm, GS3) konzentriert und einmal mit 50 ml 1 mM Tris-HCl, pH 7.4 gewaschen. Das Zellsediment wurde in 25 ml 1 mM Tris-HCl, pH 7.4 (mit 0.1 % Bentonite äquilibriert) aufgenommen. 5 ml Glycerin (87 %) wurden hinzugefügt. Diese Suspension wurde in Schüttelflaschen (Braun Melsungen) überführt, 20 g Glasperlen (0.45 - 0.55 mm Durchmesser) hinzugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte nach Vorkühlen auf $0^{\circ}C$ in einem Zellhomogenisator (Braun Melsungen Marke MsK) (1 Min., volle Schüttelstärke, Kühlung durch Trockeneis). Das Homogenisat wurde von den Glasperlen abgegossen. Zur vollständigen Lysis der Zellen und Zellorganellen wurden SDS in einer Endkonzentration von 0.5 % und 1 Volumen Phenol hinzugefügt. Die Suspension wurde für 1 Stunde bei $0^{\circ}C$ leicht gerührt. Die Phasentrennung erfolgte durch anschließende Zentrifugation (10 Min. bei 10 000 rpm, SS34). Phenolextraktionen wurden so oft wiederholt, bis keine Trübung der wässrigen Phase mehr sichtbar war.

Die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase wurden dann durch Ethanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden in 100 µl 0.1 x SSC gelöst. 100 µl 4 M LiCl in 2 x SSC wurden zur selektiven Abtrennung von ribosomaler RNA hinzugefügt. Der Hauptanteil von rRNA präzipitiert unter diesen Bedingungen (Avital und Elson, 1969) und wurde nach 20 Min. Inkubation bei $0^{\circ}C$ durch Zentrifugation (10 Min. in einer Eppendorf Zentrifuge) entfernt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden durch Ethanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden in 1 ml 50 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (äquilibriert mit 0.1 % Bentonite) gelöst. Anschließend wurde DNA mit DNase verdaut (100 µl DNase (1 mg/ml), 30 Min., $37^{\circ}C$).

Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die RNA in 100 µl TE-Puffer gelöst.

2.9.1.1. Pufferäquilibrierung mit Bentonite.
Bentonite dient als Absorptionsmittel für Nukleasen bei Nukleinsäurepräparationen (Fraenkel-Conrat et al.,1961)

2 g Bentonite wurden in 40 ml sterilem Aqua dest. suspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (15 Min. bei 2.500 rpm, SS34), das Sediment verworfen und der Überstand erneut zentrifugiert (20 Min. bei 8500 rpm, SS34). Das Sediment dieser Zentrifugation wurde in 20 ml 100 mM Na_2EDTA, pH 7 aufgenommen und für 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Zentrifugationen, wie oben beschrieben, wiederholt und das Sediment der zweiten Zentrifugation in 20 ml 10 mM NaAcetat, pH 6, aufgenommen. Diese Lösung wurde für 20 Min. bei 8500 rpm (SS34) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 mM NaAcetat, pH 6, aufgenommen. Die Konzentration wurde so gewählt, daß sie 1.5 - 6 % (w/v) Bentonite, ausgehend vom eingesetzten Trockengewicht entspricht. Die in der Präparation von dsRNA aus *Ustilago maydis* verwendeten Puffer wurden für 12 - 16 Stunden bei Raumtemperatur mit dem so behandelten Bentonite (0.1 % (w/v) Endkonzentration) äquilibriert. Das Bentonite wurde anschließend durch Zentrifugation (20 Min., 8500 rpm, SS34) entfernt.

2.9.2 Präparation von *U. maydis* DNA

2.9.2.1 Präparation von Gesamt-DNA
(in Anlehnung an Sherman et al., 1979)

Als Ausgangsmaterial wurden 2 - 5 g Zellen (logarithmische Phase) eingesetzt. Die Zellen wurden mit 50 mM Na_2EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen. Das Zellsediment wurde in 5 ml 50 mM Na_2EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,resuspendiert, 0.1 ml 2-Mercaptoäthanol (99 %) wurden hinzugefügt. Die Inkubation mit 2-Mercaptoäthanol erfolgte bei Raumtemperatur (20 Min., gelegentliches Umschütteln). Anschließend wurden die Zellen mit 50 mM Na_2EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, gewaschen. Der Zellwandabbau wurde in 5 ml SEC-Puffer mit

100 000 Einheiten β-Glucuronidase und 5000 Einheiten Sulphatase bei 32°C durchgeführt. Die Inkubation erfolgte solange, bis 80 % der Zellen nach lichtmikroskopischer Kontrolle als Protoplasten vorlagen. Die Protoplasten wurden abzentrifugiert (10 Min., 1000 rpm, SS34) und in 0.5 ml SEC-Puffer resuspendiert. 7.5 ml 50 mM Na_2EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, wurden langsam zugefügt. Hierbei lysieren die meisten Protoplasten. Zur vollständigen Lysis wurden 0.8 ml 20 % Sarkosyl hinzugefügt, das Röhrchen mehrmals invertiert und dann für 20 Min. bei 0°C inkubiert. Restliche Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 Min., 7000 rpm, SS34) entfernt. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand mit CsCl auf eine Dichte von 1.65 g/cm^3 eingestellt. Bisbenzimide (Hoechst 33258) wurde in einer Endkonzentration von 15 µg/ml hinzugefügt.

Es schloß sich eine 72stündige Zentrifugation bei 40 000 rpm in einem 50 Ti-Rotor an. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die beiden dicht beieinander liegenden Banden (unter UV 302 nm) seitlich ausgetropft. Bisbenzimide wurde durch fünfmaliges Ausschütteln mit Isopropanol (CsCl und H_2O gesättigte Lösung) entfernt. CsCl wurde durch Dialyse gegen TE-Puffer entfernt. Die Proben wurden anschließend zweimal mit Phenol extrahiert und mit Alkohol gefällt. Die DNA wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 - 500 µl TE-Puffer gelöst.

Diese DNA Präparation trennt nur bedingt mitochondriale und chromosomale DNA aus *U.maydis*. Obwohl Bisbenzimide (Hoechst 33258) präferentiell an AT-reiche DNA Sequenzen bindet und somit die Dichtedifferenz zwischen mitochondrialer (AT-reicher DNA) und chromosomaler DNA erhöht, konnten auch nach wiederholten Zentrifugationen bei Anwesenheit von Bisbenzimide keine reinen mitochondrialen und chromosomalen DNA Fraktionen gewonnen werden.

2.9.2.2 Präparation von *Ustilago maydis* mitochondrialer und chromosomaler DNA (modifiziert nach Williamson et al., 1971, Leaper et al., 1980)

Zellen einer 600 ml Kultur (stationäre Phase) wurden durch

10minütige Zentrifugation in einem H 4000 Rotor (5000 rpm, 4°C) sedimentiert. 10 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 50 ml Sucrose-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden zerrieben, bis sie sandartige Konsistenz zeigten.

Nach Abdampfen des flüssigen Stickstoffs wurden die Zellen in 1 l Sucrose-Puffer (4°C) aufgenommen und 1 Stunde bei 4°C gerührt. Durch das langsame Auftauen der Zellen in Sucrose-Puffer kommt es zur Bildung von intrazellulären Eiskristallen, die einen schonenden Aufschluß der Zellen bewirken. Die Suspension wurde anschließend in einem GSA Rotor bei 800 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Hierbei werden große Zelltrümmer und Kerne pelletiert. Der mit Mitochondrien angereicherte Überstand wurde in H 4000 Zentrifugenbechern auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 10 ml Sucrose-Puffer vorsichtig resuspendiert und erneut wie vorher zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit dem der vorigen vereinigt und bei 2000 rpm und 4°C in einem H 4000 Rotor für 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gestellt (Mitochondrienfraktion). Die Pellets der beiden Zentrifugationen wurden in 100 ml Sucrose-Puffer resuspendiert und in einem Braun-Homogenisator bei 10 000 rpm und 4°C für 2 Min. homogenisiert, um den vollständigen Aufschluß der Zellen zu gewährleisten. Das Homogenat wurde bei 2000 rpm und 4°C in einem H 4000 Rotor für 20 Min. zentrifugiert. Das hierbei entstehende Pellet wird im folgenden als Kernfraktion bezeichnet. Der Überstand wurde mit der Mitochondrienfraktion vereinigt. Die Mitochondrienfraktion wurde bei 8000 rpm und 4°C in einem GSA Rotor für 15 Min. abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen.

Die Sedimente der Kern- und Mitochondrienfraktion wurden in je 15 ml Lysepuffer aufgenommen und für 60 Min. bei 60°C inkubiert. Um einen Großteil der Proteine der lysierten Organellen zu beseitigen, wurden die Ansätze danach in Meßzylinder überführt, mit jeweils 1.1 g CsCl/ml versetzt und solange vorsichtig invertiert, bis das gesamte Salz gelöst war. Zur Entmischung von DNA und Protein wurden die Lysate 2 Stunden bei 0°C inkubiert und anschließend bei 15 000 rpm, 0°C für 15 Min. in einem SS34

Rotor zentrifugiert. Danach wurde das über der Flüssigkeit stehende Proteinpellet mit einem Spatel entfernt. Das nun klare Lysat wurde gegen 1 x TE-Puffer bei 4°C für 12 Stunden dialysiert. Danach erfolgte eine Volumeneinengung (Einlegen der Dialyseschläuche in trockenes PEG 6000) auf 10 ml. Die Proben wurden mit CsCl auf eine Dichte von 1.62 g/cm^3 eingestellt und für 72 Stunden bei 48 000 rpm, 15°C in einem 50 Ti Rotor zentrifugiert. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen in einem Gradientaustropfer eingespannt und durch eine Kanüle von 1 mm Durchmesser ausgetropft (Fraktionen von 65 - 75 µl Volumen). Aus jeder Fraktion wurde ein Aliquot von 1 µl auf eine Ethidiumbromidhaltige Agaroseplatte (EtBr 0.5 µg/ml) ausgetropft und nach Eintrocknen im UV-Durchlicht (302 nm) mit einer Polaroid-Land-Kamera fotografiert. Peakfraktionen wurden gepoolt, mit einem Zeiss Refraktometer wurde die Dichte dieser Fraktionen bestimmt. Das CsCl wurde durch 12 Stunden Dialyse gegen 1 x TE-Puffer entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Ethanol gefällt, zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 - 500 µl TE-Puffer gelöst.

2.9.3 Präparation von Plasmid DNA aus Hefe (in Anlehnung an Birnboim et al., 1979, modifiziert nach Filetici et al., 1985)

Bei dieser Präparation werden spheroplastierte Hefezellen mit NaOH lysiert. Lineare DNA wird hierbei vollständig denaturiert. Chromosomale DNA renaturiert bei der darauffolgenden Neutralisation aufgrund ihrer Komplexität nicht und läßt sich durch Zentrifugation von der Plasmid DNA trennen. Die mit dieser Präparationsmethode gewonnene Plasmid DNA wurde zur Transformation von *E.coli* Zellen benutzt.

Eine 100 ml Kultur von Hefezellen (logarithmische Phase) wurde konzentriert (10 Min., 4000 rpm, GSA), einmal mit sterilem H_2O gewaschen und in 5 ml P-Puffer resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte durch Zugabe von 1 ml Zymolyase 20 T (2 mg/ml), Inkubation bei 32°C. Die Protoplastierung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Waren 90 % der Zellen protoplastiert, wurden sie

abzentrifugiert und in 1 ml Minilysat Lösung I (ohne Lysozym) resuspendiert. Die Lysis der Zellen und die Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2 ml Minilysat Lösung II und 10minütiger Inkubation auf Eis. Neutralisiert wurde durch Zugabe von 1.5 ml Minilysat Lösung III (45 Min., 0°C).

Anschließend wurde die denaturierte chromosomale DNA pelletiert (10 Min. bei 10 000 rpm, SS34), das Pellet verworfen und der Überstand mit Alkohol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden in 1 ml TE-Puffer gelöst und mit 0.1 mg RNase für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 mg Proteinase K wurde die Inkubation für 3 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Phenolextraktionen schlossen sich an, sie wurden so oft wiederholt, bis keine Trübung der wässrigen Phase mehr sichtbar war. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von Ethanol gefällt, das Nukleinsäurepellet anschließend zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

2.9.4 Plasmidpräparation aus *E.coli*

2.9.4.1 Präparative DNA Isolierung

300 ml M9 CAA-Medium wurden mit 2 ml einer frischen Übernachtkultur beimpft und bei 37°C geschüttelt. Der exponentiell wachsenden Kultur (Klett 80) wurden 60 mg Chloramphenicol hinzugegeben. Nach Inkubation für weitere 12 - 16 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation konzentriert (10 Min. bei 5000 rpm; GS3).

Da die Replikation von pBR322 und pBR322 Derivaten keine Neusynthese von Proteinen erfordert, läßt sich die Ausbeute an Plasmid DNA relativ zu chromosomaler DNA,durch Behandlung mit Proteinsynthese-Inhibitoren wie Chloramphenicol,stark erhöhen (Clewell, 1972).

Das Zellsediment wurde in 2 ml Plasmid 1-Puffer resuspendiert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde mit 0.45 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml) versetzt und 5 Min. bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.9 ml Plasmid 2-Puffer wurde die Inkubation für5 Min. fortgesetzt. Durch Zugabe von 3.6 ml Plasmid 3-Puffer und anschließendem mehrmaligem Invertieren

des Röhrchens erfolgte vollständige Lysis der Zellen. Nach Zentrifugation (1 Stunde bei 15 000 rpm; SS34) wurde der klare Überstand vorsichtig abgenommen und mit TE-Puffer auf ein Volumen von 10 ml gebracht. Zu dieser Lösung wurden 9.54 g CsCl und 0.6 ml EtBr-Lösung (5 mg/ml) gegeben. Die Dichte der Lösung betrug etwa 1.55 g/ml. Die Röhrchen wurden austariert und dann zugeschweißt. Nach 48stündiger Zentrifugation (45 000 rpm; 50 Ti; 15°C) wurde die untere der sichtbaren Banden mit Hilfe einer Kanüle seitlich ausgetropft. Anschließend wurde das Ethidiumbromid durch fünfmaliges Ausschütteln mit Isopropanol (mit CsCl und H_2O gesättigt) entfernt. Zur Entfernung des CsCl erfolgte eine Dialyse gegen TE-Puffer (30 Min. bei 4°C).

Die DNA wurde zweimal mit Phenol extrahiert. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 2 Volumina Ethanol und mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und für 10 Min. auf -70°C abgekühlt. Nach Zentrifugation (10 Min., 4°C) wurde das Sediment mit 80 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst.

2.9.4.2 DNA Isolierung nach Birnboim et al. (1979)

Bei dieser Methode werden die Zellen mit NaOH lysiert. Dabei wird lineare DNA vollständig denaturiert. Aufgrund ihrer Komplexität renaturiert chromosomale DNA nach Neutralisation nicht. Die denaturierte chromosomale DNA läßt sich durch Zentrifugation von der Plasmid DNA abtrennen.

4 ml einer Übernachtkultur wurden 2 Min. abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Die Zellen wurden in 200 µl Minilysat-Lösung I resuspendiert und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Die Lysis der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 400 µl Minilysat-Lösung II und einer fünfminütigen Inkubation bei 0°C. Nach Zugabe von 300 µl Minilysat-Lösung III, vorsichtigem Mischen und weiterer Inkubation bei 0°C für 60 Min. wurden Zelltrümmer, denaturierte chromosomale DNA und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation (5 Min., Eppendorf Zentrifuge) von der Plasmid DNA abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit 1.5 ml absolutem Ethanol versetzt. Nach 10 Min. bei

-70°C wurden die Proben abzentrifugiert (10 Min.; Eppendorf Zentrifuge). Das Sediment wurde in 200 µl Minilysat-Lösung IV resuspendiert, die Plasmid-DNA nochmals Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Die getrocknete DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst.

2.9.4.3 Minipräparation von einzelsträngiger M13 DNA

M13 Phagen lassen sich aus dem Überstand infizierter *E.coli*-Kulturen isolieren. 1.2 ml einer Übernachtkultur von mit M13 Phagen infizierten JM103-Zellen wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge 15 Min. abzentrifugiert; der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals 15 Min. zentrifugiert, um eventuell noch in der Lösung verbliebene Zellen zu entfernen. 1 ml des Überstandes wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl PEG-Lösung (20 % PEG 6000 (w/v); 2.5 M NaCl) versetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben 30 Min. in ein Eisbad gestellt. Die präzipitierten Phagen wurden abzentrifugiert (5 Min.; 4°C). Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde zweimal mit je 50 µl Phenol extrahiert und nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Die getrocknete DNA wurde in 20 µl TE-Puffer gelöst. Mit dieser Methode ließ sich aus 1 ml Kulturüberstand etwa 1 µg einzelsträngige DNA isolieren.

2.9.5 Präparative Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA Restriktionsfragmenten wurden präparative Agarosegele (20 cm x 20 cm x 0.3 cm) verwendet. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele mit EtBr-Lösung (0.5 µg/ml) gefärbt und die DNA Banden im UV Auflicht (260 nm) sichtbar gemacht. Die gewünschten DNA Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde durch Elektroelution aus der Agarose zurückgewonnen. Dazu wurden die Gelstücke zusammen mit etwa 0.2 ml E-Puffer in Dialyseschläuche überführt, Luftblasen entfernt, die Dialyseschläuche verschlossen und in eine horizontale Gelapparatur gelegt. Die Apparatur wurde mit E-Puffer gefüllt, so

daß die Dialyseschläuche gerade mit Puffer bedeckt waren. Die Elektroelution erfolgte bei 100 V für 0.5 bis 2 Stunden (je nach Molekulargewicht der DNA Fragmente). Nach beendeter Elution wurde das elektrische Feld für 15 Sek. umgepolt, um die DNA vom Dialyseschlauch zu lösen. Anschließend wurde das Eluat quantitativ aus den Dialyseschläuchen entfernt, diese mit etwa 0.2 ml TE-Puffer nachgespült und die beiden Lösungen vereint.

Die Reinigung und Konzentrierung der DNA Fragmente erfolgte an kleinen Ionenaustauscher-Säulen (Elutip-d Säulen, Schleicher & Schuell). Zur Vorbereitung der Säulen wurden diese mit 2 ml High-Salt-Puffer gewaschen und anschließend mit 3 ml Low-Salt-Puffer äquilibriert. Die NaCl-Konzentration der DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 5 M NaCl-Lösung auf 0.2 M NaCl gebracht und die Lösung über die vorbereitete Säule gegeben. Nach Waschen mit 2 ml Low-Salt-Puffer wurde die DNA mit 0.4 ml High-Salt-Puffer eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt, das Präzipitat mit 1 ml 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.9.6 Extraktionen wässriger DNA Lösungen mit Phenol

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA Lösungen wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (1 Min., Raumtemperatur). Die wässrige Phase wurde abgehoben und in ein neues Gefäß überführt. Die Phenolphase wurde verworfen.

2.9.7 Fällen von DNA

Zur Fällung von DNA in wässrigen Lösungen wurde der Ansatz mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4.8 und 2 Volumina Ethanol versetzt und für 10 - 20 Min. auf -20°C abgekühlt. Nach Zentrifugation (20 Min., 4°C) wurde das Sediment mit 80 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 1 x TE-Puffer gelöst.

2.10 Methoden zur *in vitro* Rekombination von Nukleinsäuren

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den jeweiligen, unter 2.5 genannten, Pufferbedingungen. Ein analytischer Ansatz enthielt:

1 µg DNA
40 µg/ml BSA
1 U Enzym
in 25 µl Restriktionspuffer.

Nach Inkubation für 2 Stunden bei 37°C wurden dem Ansatz 5 µl DNA-Probenpuffer hinzugefügt und die Reaktionsprodukte auf Gelen analysiert.

Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit T4 DNA Ligase durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (25 µl) enthielt:

10 mM Tris-HCl, pH 7.6
10 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
0.6 mM ATP
1 µg DNA (kohäsive Enden)
1 U T4 DNA Ligase

Zur Ligation von DNA Fragmenten mit glatten Enden wurden 2 Einheiten T4 DNA Ligase eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei 15°C für 16 Stunden inkubiert. Vektor DNA und DNA Fragmente wurden im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt.

Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-Phosphate von Restriktionsfragmenten lassen sich durch alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) abspalten. Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt:

10 mM Tris-HCl, pH 8.5
10 mM NaCl
1 µg DNA
1 µl Phosphatase (2.5 U/µl)

Der Ansatz wurde 30 Min. bei 60°C inkubiert. Nach der Reaktion wurden 150 µl H_2O hinzugegeben und der Ansatz 3 mal mit Phenol extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt, das Präzipitat mit 80 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Auffüllen von zurückstehenden 3' OH-DNA Enden

Die zurückstehenden 3' OH-DNA Fragmentenden lassen sich durch DNA Polymerase I (Klenow Fragment) auffüllen . Ein Reaktionsansatz (25 µl) enthielt:

50 mM Tris-HCl, pH 7.2
10 mM $MgSO_4$
0.1 mM DTT
50 mg/ml BSA
1 µg DNA
2 mM dGTP
2 mM dATP
2 mM dCTP
2 mM dTTP
1 U DNA Polymerase I (Klenow Fragment)

Der Ansatz wurde 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0.5 M Na_2EDTA, pH 7.5, gestoppt und der Ansatz mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

2.11 Mikrobiologische und genetische Methoden

2.11.1 Kulturbedingungen für *Ustilago maydis*

Falls nicht anders angegeben wurden Flüssigkulturen in NSY-Medium mit einem Titer von 1 x 10^5 Zellen/ml inkubiert (Zelltiterbestimmung nach 2.11.10) und 12 - 48 Stunden in Erlenmeyerkolben bei 32°C und 200 Upm geschüttelt. Bei 1 x 10^6-10^7 Zellen/ml befindet sich die Kultur in der Log-Phase und bei ca. 2 x 10^8 Zellen/ml in der stationären Phase.

Plattenausstriche auf VM-Platten wurden 2 Tage bei 32°C inkubiert. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt und alle 4 Wochen auf VM passagiert. Zur Konservierung von Stämmen wurden Zellen aus einem frisch gewachsenen VM-Plattenausstrich in trockenes Silikagel überführt und bei 4°C aufbewahrt.

2.11.2 Keimung von *Ustilago*-Brandsporen

Eine Spatelspitze *U.maydis* Sporen wurden in 20 ml 1 % Triton X-100-Lösung für 30 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden sie über ein Nalgene Einmalfilter (Durchmesser: 6 cm) abgefiltert und dreimal mit sterilem H_2O dest. gewaschen. Die Sporen

wurden in 1 ml sterilem H_2O dest. resuspendiert. Zur Keimung wurden 20 µl auf VM-Platten ausgestrichen und 3 - 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die nach dieser Zeit gewachsenen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf VM-Platten übertragen und erneut bei 30°C auf Koloniengröße angezogen. Diese Kolonien wurden auf Einzelkolonien ausgestrichen.

2.11.3 Kompatibilitätstest haploider *Ustilago* Stämme (Platemating) nach Puhalla (1968)

Um haploide *Ustilago* Stämme auf ihre sexuelle Kompatibilität zu testen, wurden Kulturen aus der späten logarithmischen Phase, die wie unter 2.11.1 beschrieben hergestellt wurden, verwendet. 1 ml dieser Kultur wurde zentrifugiert (30 sec in einer Eppendorf Zentrifuge), die sedimentierten Zellen einmal mit sterilem H_2O gewaschen und in 1 ml sterilem H_2O aufgenommen. Je 1 µl der Zellsuspensionen wurden im Abstand von 1 mm auf PM-Platten getropft und nach Eintrocknen bei 26°C bei konstantem Licht (Platten invertiert) für 48 Stunden inkubiert. Eine positive Matingreaktion zwischen zwei kompatiblen Stämmen äußert sich durch die Ausbildung eines weißen Luftmycels im Kontaktbereich der aufeinander zugewachsenen Kolonien.

2.11.4 Interstrain Inhibition Test von *U.maydis* (Puhalla, 1968)

Zellsuspensionen wurden wie in 2.11.3 beschrieben hergestellt. Die auf Killer-Phänotyp zu testenden *Ustilago* Stämme wurden auf Interstrain-Inhibition Platten getropft und für 24 Stunden bei 26°C inkubiert. In dieser Zeit diffundiert das Killer-Toxin ins umgebende Medium und kann die 24 Stunden später in 1 mm Abstand aufgetropften Stämme im Wachstum beeinflussen. Toxindiffusion wird durch Wachstumsinhibition des zur Testerseite liegenden Bereichs des nachträglich aufgetragenen *Ustilago* Stammes angezeigt.

2.11.5 Infektion von Maispflanzen verändert nach Holliday (1961b)

Sporidien von frisch ausgestrichenen Übernachtkulturen wurden

zum Beimpfen von 25 ml NSY-Medium verwendet. Diese Kultur wurde bis zu einem Titer von 1 x 10^7 Zellen/ml bei 32°C geschüttelt. Ein Aliquot von 1 ml wurde abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit sterilem H_2O dest. gewaschen und in 1 ml sterilem H_2O dest. aufgenommen. Suspensionen entsprechender Stämme wurden vor der Inokulation in den gewünschten Kombinationen im Verhältnis 1:1 gemischt. 2-3 Wochen alte im Gewächshaus gezogene Maispflanzen wurden mit einem sterilen Zahnstocher, der in die vorbereitete Pilzsuspension getaucht wurde, im Bereich des ersten Knotens mehrfach angestochen. Nach 10-20 Tagen Wachstum unter normaler Tagesrythmik zeigten sich bei infizierten Pflanzen Gallen. Kontrollansätze wurden mit den einzelnen Kreuzungspartnern und mit H_2O durchgeführt. Pro Ansatz wurden 8-12 Pflanzen inokuliert.

2.11.6 Kulturbedingungen für Hefe

Falls nicht anders angegeben wurden Flüssigkulturen in YPD- oder YNB-Medium mit einem Titer von 1 x 10^5 - 5 x 10^5 Zellen/ml inkubiert (Zelltiterbestimmung nach 2.11.10) und 10-48 Stunden in Erlenmeyerkolben bei 32°C und 200 Upm geschüttelt. Bei 5 x 10^6 - 5 x 10^7 Zellen/ml befinden sich die Zellen in der logarithmischen Phase und bei 2 - 5 x 10^8 Zellen/ml in der stationären Phase. Plattenausstriche auf YPD-Platten wurden für zwei Tage bei 32°C inkubiert. Plattenausstriche auf YNB (+ Zusätze) wurden für 3 - 5 Tage bei 32°C inkubiert. Zur Konservierung von Stämmen wurden Zellen aus frisch gewachsenen Plattenausstrichen in trockenes Silikagel überführt und bei 4°C aufbewahrt.

2.11.7 Transformation von spheroplastierten Hefezellen mit Plasmid DNA (in Anlehnung an Hinnen et al., 1978)

Pro Transformationsansatz werden 1 x 10^9 Zellen und 1 µg Plasmid DNA eingesetzt. Eine Hefekultur (6-8 Stunden Inkubation in 10 ml YPD bei 30°C) wurde 1:1000 in 100 ml YPD verdünnt und bis zu einer Zelldichte von 1 x 10^7/ml bei 30°C kräftig geschüttelt (8-10 Stunden). Die Zellen wurden konzentriert, einmal mit sterilem H_2O und zweimal mit 50 mM Tris-HCl, pH 9, gewaschen. Das

Zellpellet wurde in 5 ml 0.3 g Natriumthioglykolat, 50 mM Tris-HCl, pH 9, resuspendiert und für 30 Min. bei 30°C (100 Upm im Luftschüttler) inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend sedimentiert und zweimal mit je 10 ml P-Puffer gewaschen. Vor dem letzten Waschvorgang wurden 100 µl entnommen und Verdünnungen zur Zellzahlkontrolle auf YPD-Platten ausgestrichen.

Zur Spheroplastierung wurden die Zellen in 10 ml P-Puffer resuspendiert, 2 mg Zymolyase 20 T zugesetzt und für 1-2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spheroplasten wurden pelletiert und dreimal vorsichtig mit je 10 ml STC gewaschen. Alle Zentrifugationen erfolgten für 5 Min. bei 3000 rpm im SS34 Rotor. Vor dem dritten Waschvorgang wurde ein 100 µl Aliquot entnommen, in STC verdünnt und parallel auf YPD-Platten ausgestrichen (Spheroplastierungskontrolle) und in YPD-Regenerationsagar eingebettet (Regenerationskontrolle).

Die gewaschenen Spheroplasten wurden in 1 ml STC resuspendiert, 1 µg Plasmid DNA und 20 µg gescherte Kalbsthymus-DNA wurden in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt. Die Inkubation mit DNA erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Min. Anschließend wurden 10 ml 20 % PEG-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation mit PEG fand für 10 Min. bei Raumtemperatur statt. Die Spheroplasten wurden sedimentiert und in 1 ml STC resuspendiert. Es wurden 0.5 ml YPD, 1 M Sorbitol hinzugefügt und die Spheroplastensuspension für 30 Min. bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Spheroplasten abzentrifugiert, in 5 ml STC resuspendiert und in 200 ml YNB-Regenerationsagar eingebettet. Der Spheroplastierungsgrad mit dieser Methode lag für unsere Labor-Hefestämme zwischen 95 - 99 %, die Regenerationsfähigkeit zwischen 1 - 5 %. 1×10^3 - 1×10^4 Transformanden pro µg Yep24 DNA wurden hiermit erhalten.

2.11.8 Transformation von *E.coli* mit Plasmid DNA

Transformation von *E.coli*-Zellen erfolgte nach einer Vorschrift von Cohen et al. (1972). Eine frische Übernachtkultur wurde 1:20

in 10 ml dYT-Medium verdünnt und im Wasserbad bis zu einer Dichte von 100 Klett-Einheiten geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 Min. (Christzentrifuge) geerntet. Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert, 30 Min. bei 0°C inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 0.5 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert.

Für die Transformation wurden 200 µl dieser Zellsuspension mit 100 µl DNA-Lösung (in 50 mM $CaCl_2$) vorsichtig gemischt und 15 Min. bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Min. auf 40°C oder alternativ für 10 Min. auf 22°C (ts-Mutanten) erwärmt. Zur phänotypischen Expression der Antibiotika Resistenz wurde der Transformationsansatz mit 1 ml dYT-Medium versetzt und für 30 Min. bei 37°C oder 22°C inkubiert. Verdünnungen wurden auf selektiven YT-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Mit dieser Methode wurden etwa 10^5 bis 10^6 Transformanten pro µg pBR322 DNA erhalten.

2.11.9 Test auf α-Komplementation nach Transformation mit M13mp9 DNA

Bei Transformation von JM103 mit M13mp9 Derivaten wurden Transformanden durch Plattierung in Soft-Agar identifiziert. Infizierte Zellen wachsen sehr langsam und können deshalb als "Plaques" in einem Bakterienrasen identifiziert werden. M13mp9 ist in der Lage, die lacZ Mutation der Wirtszelle zu komplementieren (intracistronische α-Komplementation, Ullmann et al., 1970). Expression der βGalaktosidase führt zur Spaltung des eingesetzten Substrates X-gal und zur Freisetzung des blauen Farbstoffes Bromchlorindol. Infektion von Zellen mit Wildtyp M13mp9 Phagen führt deshalb zu blauen "Plaques". Rekombinante M13mp9 Phagen bilden weiße "Plaques", da die inserierten DNA-Fragmente das lacZ Gen von M13mp9 zerstört haben. Zur Plattierung von Transformanden wurde folgender Ansatz gemacht:

0.1 ml X-gal (2 % in Dimethylformamid)
0.04 ml 50 mM IPTG
0.05 ml JM103 (Übernachtkultur)
3 ml Na-Soft

Diese Mischung wurde mit Transformationsansatz (2.11.8) gemischt, auf einer YT-Platte verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiße "Plaques" wurden mit Zahnstochern in dYT-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Aufarbeitung von einzelsträngiger DNA erfolgte wie unter 2.9.4.3 beschrieben.

2.11.10 Bestimmung von Zelltitern

Die Zelltiter von *Ustilago* Kulturen wurden mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer (Typ Assistent: Tiefe 0.1 mm, Zählfläche 0.0025 mm^2) bestimmt.

Die Zelltiter von Bakterienkulturen wurden photometrisch in einem Klett-Photometer (A. Thomas Comp., Philadelphia) bestimmt. Dabei gilt:

10 Klett-Einheiten = 1×10^8 Zellen/ml und
100 Klett-Einheiten = 1×10^9 Zellen/ml

3. ERGEBNISSE

3.1 Phytopathogenität der *U.maydis* Stämme 32 und 126 und von doppelsträngiger RNA (dsRNA) freien Derivaten der gleichen Stämme

1968 wurde von Puhalla Wachstumsinhibition von *U.maydis* Stämmen auf festen Nährmedien durch benachbart wachsende Stämme beschrieben. Dieses Phänomen wurde "Interstrain Inhibition" genannt. Die Inhibition wird durch ein toxisches Protein, das von sogenannten Killerstämmen sekretiert wird, hervorgerufen (Hankin und Puhalla, 1971). Die Toxinproduktion, ebenso wie Immunität gegen das Toxin, wird extrachromosomal vererbt. Träger der Information ist doppelsträngige RNA (dsRNA), die in VLP's (virus like particles) verpackt ist (Wood und Bozarth, 1973). Das dsRNA Genom eines Killerstammes setzt sich aus mehreren definierten Segmenten unterschiedlichen Molekulargewichts zusammen. Diese Segmente werden in die Größenklassen H (heavy, 2.9 - 1.8 x 10^6 Dalton), M (medium, 0.9 - 0.4 x 10^6 Dalton) und L (light, 0.05 x 10^6 Dalton) unterteilt (Koltin et al., 1978).

Es sind drei Killerstämme (P1, P4, P6) bekannt, die sich in der Zusammensetzung der dsRNA Segmente der Größenklasse H und M unterscheiden. Gemeinsam ist ihnen das L1 Segment (Koltin et al., 1978).

Killerstämme sezernieren Toxine unterschiedlicher Spezifität. Ein Killerstamm ist immun gegen das eigene Toxin und sensitiv gegenüber Toxinen anderer Spezifität (Koltin und Day, 1976a).

Der Hauptanteil einer *U.maydis* Wildtyppopulation zeichnet sich durch Toxinsensitivität aus. Einige Zellen in einer solchen Population besitzen jedoch chromosomale Resistenzen, die für jedes Killertoxin spezifisch sind und voneinander unabhängig vererbt werden (Koltin und Day, 1976a). Ungefähr 20 % der sensitiven Stämme besitzen dsRNA Segmente, die nicht in VLP's verpackt sind und nicht den vollständigen Killer Segmentmustern entsprechen (Koltin und Day, 1976b). Der Einfluß des dsRNA Status von *U.maydis* Stämmen auf die Pathogenität wurde nach Kreuzung

von dsRNA freien Stämmen (aus einer Wildtyppopulation) mit dsRNA Stämmen analysiert. Hierbei wurden keine signifikanten Veränderungen im Pathogenitätsverhalten festgestellt (Day, 1981). Ich habe untersucht, ob sich die Pathogenitätsreaktion von kompatiblen *U.maydis* Stämmen ändert, wenn man die dsRNA aus beiden Stämmen entfernt.

Alle aus einer Wildtyppopulation isolierten *U.maydis* Stämme wurden im Interstrain Inhibition Test" (2.11.4) untereinander und gegen 22903(P1) auf Toxinproduktion und -reaktion untersucht. Kein *U.maydis* Wildstamm zeigte Inhibitoreigenschaften, während alle durch 22903 (P1) inhibiert wurden. Das bedeutet, daß kein Wildtypstamm ein Killerstamm vom Typ P1 ist (es tritt keine Immunität auf) und auch keine chromosomale Resistenz gegen das Killertoxin von P1 in der getesteten *U.maydis* Population vorhanden ist. Daraufhin wurde der dsRNA-Status mehrerer kompatibler *U.maydis* Stämme analysiert.

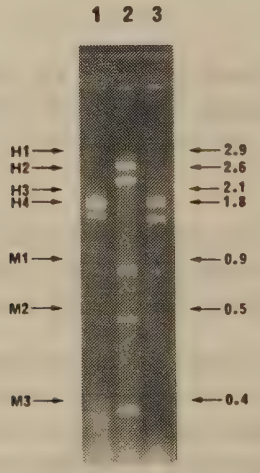


Abb. 2: dsRNA-Vergleich von *U.maydis* 126, 32 und 22903(P1). dsRNA wurde wie in 2.9.1 beschrieben isoliert. Die Trennung der Segmente erfolgte in einem 0.8 % Agarosegel.
1 - *U.maydis* 126
2 - *U.maydis* 22903(P1)
3 - *U.maydis* 32
Molekulargewichtsangaben (x 10^6 Dalton) und dsRNA Segmentbezeichnungen nach Koltin et al. (1978).

Das L1 dsRNA Segment von 22903 ist nicht dargestellt.

Alle analysierten *U.maydis* Stämme zeigten das gleiche dsRNA Muster. Deshalb ist stellvertretend in Abb. 2 das dsRNA Segmentmuster von *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 dargestellt.

U.maydis 126 und *U.maydis* 32 wurden für den Versuch, dsRNA-freie Stämme zu isolieren und dann in ihrem Pathogenitätsverhalten zu untersuchen, ausgewählt. Sie sind in ihrer pathogenen Reaktion eindeutig charakterisiert; 6-8 von 10 infizierten Pflanzen bilden große Gallen am Sproß und kleinere Gallen an Blättern. Um dsRNA-freie Stämme zu isolieren, wurde nach der für Killerstämme von *Saccharomyces cerevisiae* entwickelten Methode von Fink und Styles (1972) verfahren. Das Kurieren von dsRNA wird bei dieser Methode durch Zugabe von Cycloheximid erreicht. Cycloheximid inhibiert die Proteinsynthese an cytoplasmatischen Ribosomen (Hartwell et al., 1970). Unter den von Fink und Styles gewählten Bedingungen wird die Zellteilung verzögert und die Synthese der für dsRNA Replikation wichtigen Proteine verhindert. Der dsRNA Gehalt wird stark reduziert und bei nachfolgenden Zellteilungen entstehen Tochterzellen, die frei von dsRNA sind. In Vortests wurde für *U.maydis* diejenige Konzentration an Cycloheximid ermittelt, die einen deutlichen Effekt auf die Zellteilungsrate hat, das Wachstum von *U.maydis* jedoch nicht unterbindet. Hierzu wurde die Wachstumsinhibition in Flüssigkultur von *U.maydis* 32 in Abhängigkeit von der zugesetzten Cycloheximidkonzentration bestimmt. 2 µg/ml Cycloheximid zeigten den gewünschten Effekt. Cycloheximid dieser Konzentration wurde allen VM-Platten für die dsRNA Kurierungsexperimente zugesetzt. Einzelkolonien von *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 wurden 10 mal über Ausstriche auf VM + Cycloheximid (2 µg/ml) passagiert. Nach 5 Passagen von Einzelkolonien auf VM + Cycloheximid (2 µg/ml) waren dsRNA-Segmente noch in 3 von 5 Einzelkolonien (*U.maydis* 126) und in 2 von 5 Einzelkolonien (*U.maydis* 32) vorhanden (Abb. 3). Nach 10 Passagen war in keiner der analysierten Einzelkolonien mehr dsRNA nachweisbar (Abb. 4).

Im Pflanzentest wurden je 5 Einzelkolonien der zehnten Passage der *U.maydis* Ausgangsstämme 32 und 126 miteinander, allein und in Kombination mit den Ausgangsstämmen untersucht. Alle Kombinationen kompatibler *U.maydis* Stämme zeigten die für die Aus-

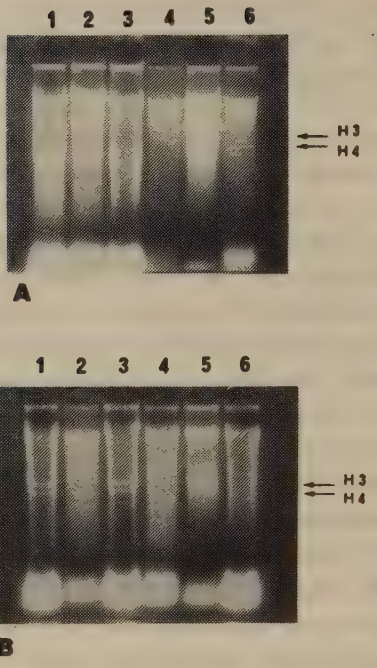


Abb. 3: dsRNA aus je 5 Einzelkolonien von *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 nach 5 Passagen auf VM + Cycloheximid (2 µg/ml). dsRNA aus *U.maydis* wurde abweichend von der in 2.9.1 beschriebenen Methode präpariert. Nach der wie in 2.9.1 beschriebenen Zellhomogenisation schlossen sich differentielle Zentrifugationen mit dem Homogenisat an. Eine Zentrifugation (1000 xg) führte zu einer 1000 xg genannten Sedimentfraktion, die Zentrifugation des Überstandes zu der 16 000 xg genannten Fraktion. Beide Sedimente wurden anschließend in 10 ml TE-Puffer aufgenommen, die Zellorganellen durch Zugabe von Sarkosyl (Endkonzentration 2%, 2 Stunden, 60°C) lysiert. Proteine wurden durch Zugabe von NaCl (Endkonzentration 1 M, 4 Stunden, 4°C) präzipitiert und abzentrifugiert. Die Überstände der 1000 xg und 16 000 xg Fraktionen wurden mehrmals mit Phenol extrahiert und die Nukleinsäuren anschließend mit Alkohol gefällt. Sie wurden in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Es erfolgten keine DNase Inkubationen. Die Nukleinsäuren (50 µl) wurden in 1.2 % Agarosegelen aufgetrennt.

A: 1 *U.maydis* 126 (16 000 xg Fraktion)
2-6 *U.maydis* 126 Derivate (16 000 xg Fraktion)

B: 1 *U.maydis* 32 (16 000 xg Fraktion)
2-6 *U.maydis* 32 Derivate (16 000 xg Fraktion)

Die Bezeichnung der Segmente erfolgte wie in Abb. 2.

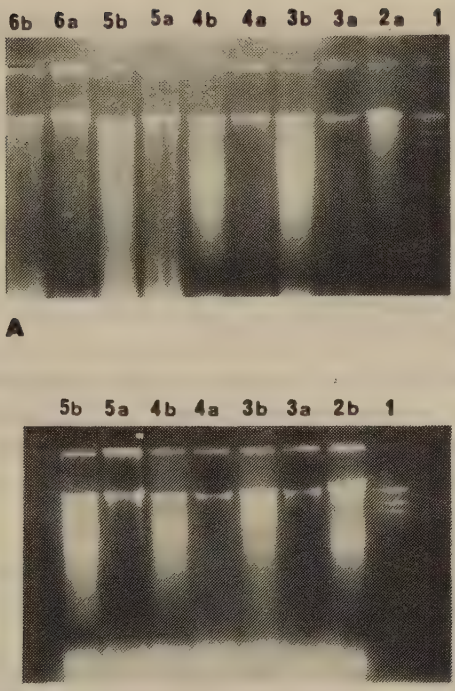


Abb. 4: dsRNA aus Einzelkolonien von *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 nach 10 Passagen auf VM + Cycloheximid (2 µg/ml). dsRNA wurde wie für Abb. 3 beschrieben isoliert.

Die Nukleinsäuren wurden in 1.2 % Agarosegelen aufgetrennt.

a - 1000 xg Fraktion
b - 16 000 xg Fraktion

A: 1 - DNA Größenstandard: λ-DNA (HindIII)
2 - *U.maydis* 126
3-6 - *U.maydis* Derivate 126

B: 1 - DNA Größenstandard: λ-DNA (HindIII)
2 - *U.maydis* 32
3-5 - *U.maydis* 32 Derivate

gangsstämme charakteristische Pathogenitätsreaktion im Pflanzentest. Damit ist ausgeschlossen, daß extrachromosomal vorliegende dsRNA an der Pathogenitätsreaktion der in dieser Arbeit verwendeten *U.maydis* Stämme 126 und 32 beteiligt ist.

3.2 Experimentelle Strategien zur Entwicklung eines Transformationssystems für *U.maydis*

Bis heute sind für eine ganze Reihe von Pilzarten Transformationssysteme etabliert worden. Die Entwicklung dieser Systeme war möglich durch

- ein Transformationssystem, welches effiziente DNA Aufnahme sicherstellt;
- ein Selektionssystem, das die Identifizierung von Transformanden erlaubt;
- die Gewährleistung der Stabilität eingeführter DNA, die entweder durch Integration ins Wirtsgenom oder durch autonome Replikation der eingebrachten DNA erreicht wird;
- die korrekte Expression der eingeführten Gene

Um ein Transformationssystem für *U.maydis* zu entwickeln, wurden deshalb folgende experimentelle Strategien verfolgt:

Zur Vektorkonstruktion für den Aufbau eines Transformationssystems bieten sich die, in vielen Pilzspezies vorhandenen Plasmide oder plasmidähnlichen DNAs an (Esser et al., 1984; Tudzynski und Esser, 1985). Eine Charakterisierung von Nukleinsäuren aus *U.maydis* hat jedoch bisher keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Plasmiden oder plasmidähnlichen DNAs gegeben (Schulz, 1986). Eine weitere Möglichkeit Vektoren zu konstruieren, basiert auf der Identifizierung von Sequenzen, die im heterologen Hefesystem die Eigenschaft von Replikationsorigins haben (Stinchcomb et al., 1980). Die Isolierung solcher als ARS bezeichneten DNA Sequenzen(autonomous replicating sequences) ist für viele Eucaryoten beschrieben, wie z.B. für *Neurospora crassa, Dictyostelium discoideum, Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, Zea mays* (Stinchcomb et al., 1980), *Candida utilis* (Tikhomirova et al., 1983; Hsu et al., 1983), *Paramecium aurelia* (Lazdins und Cummings, 1984), *Cephalosporium acremonium* (Tudzynski und Esser, 1982; Skatrud und Queener, 1984), *Podospora anserina* (Lazdins und Cummings, 1982), *Chlamydomonas reinhardii* (Loppes und Denis, 1983; Vallet et al., 1984), *Absidia glauca* (Burmester und Wöstemeyer, 1986), und *Aspergillus nidulans* (Tilburn et al.,

1983; Turner und Ballance, 1985).

Einige der so identifizierten ARS-Fragmente erlauben Replikation in den entsprechenden homologen Systemen (z.B. in *Chlamydomonas reinhardii* (Rochaix et al., 1984), *Cephalosporium acremonium* (Tudzynski und Esser, 1985).

Um im homologen System Transformanden identifizieren zu können, müssen selektionierbare Eigenschaften zur Verfügung stehen. Hierfür eignen sich Resistenzen gegenüber Antibiotika und Fungiziden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Komplementation auxotropher Mutationen. Grundvoraussetzung für effiziente Transformation von Pilzen ist die Spheroplastierung mit geeigneten zellwandabbauenden Enzymen und eine hohe Regenerationsrate der Spheroplasten.

3.2.1 Isolierung von *U.maydis* ARS-Fragmenten

Eine essentielle Eigenschaft eines Klonierungsvektors ist die Fähigkeit, autonom zu replizieren. Diese Fähigkeit erhält er durch Insertion geeigneter Replikationsorigins. Alle in einer Zelle vorhandenen DNAs (Plasmid-, Kern-, Mitochondrien-, Plastiden-DNA) können als Ausgangsmaterial für die Suche nach Replikationsorigins dienen. Mit einer von Stinchcomb et al. (1980) entwickelten Methode ist es möglich, in Hefe autonom replizierende eukaryotische DNA Sequenzen zu identifizieren. Hierfür wird fremde DNA in einen *E.coli* Hefevektor wie YIp5, der ein in Hefe selektionierbares Gen (URA3) besitzt, aber keinen Hefe-Replikationsorigin hat, insertiert und in Hefezellen (ura 3-52) transformiert. Sequenzen, die autonome Replikation des Plasmids bewirken, erhöhen die Transformationseffizienz (URA^+) drastisch im Vergleich zu YIp5. YIp5 DNA muß über homologe Rekombination ins Wirtsgenom integrieren, um Transformanden zu erzeugen. Die für autonome Replikation verantwortlichen Sequenzen werden ARS (für autonomous replicating sequences) genannt.

Charakteristisch für Vektoren mit ARS-Fragmenten ist neben der erhöhten Transformationseffizienz, eine erhöhte Instabilität

des Plasmids in Transformanden im Vergleich zur Stabilität von Plasmiden, die den Hefeplasmid-Origin (2 micron Plasmid) benutzten. Ferner läßt sich eine mit der Instabilität korrelierbare Verlängerung der Generationszeiten, verursacht durch den Verlust des URA3^{+}-Phänotyps, beobachten.

3.2.1.1 "Shotgun"-Klonierung von *U.maydis* Gesamt DNA in YIp5 (Hefe-*E.coli* Vektor)

Gesamt DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 wurde wie in 2.9.2.1 beschrieben präpariert, mit EcoRI verdaut und die entstandenen Fragmente mit EcoRI linearisierter YIp5 DNA ligiert.

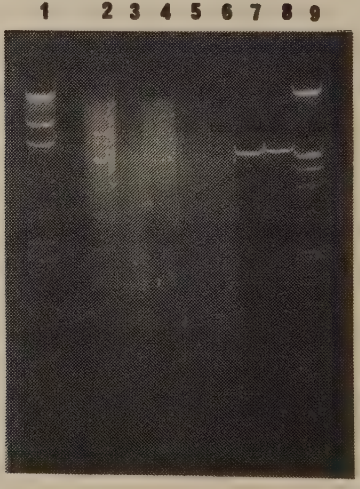


Abb. 5: Restriktionsverdaus von YIp5 und *U.maydis* DNA mit EcoRI. Die DNA wurde in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

1 - DNA-Größenstandard: λDNA (HindIII)
2 - 4 - Gesamt DNA aus *U.maydis* 32
5 + 6 - Gesamt DNA aus *U.maydis* 126
7 + 8 - YIp5
9 - DNA-Größenstandard: λDNA (EcoRI + HindIII)

Abb. 5 zeigt die für einen Restriktionsverdau von Gesamt DNA mit EcoRI typischen Fragmentbanden in einem starken Hintergrund elektrophoretisch nicht auflösbarer Fragmente.

Der Hefestamm Y220 (ura3-52, trp1, leu2, his4) wurde mit 1 µg ligierter DNA wie in 2.11.7 beschrieben transformiert. Die Selektion erfolgte auf $URA3^+$ Klone. Für den Ligationsansatz YIp5/*U.maydis* 32 DNA wurden 17 Hefetransformanden, für den Ligationsansatz YIp5/*U.maydis* 126 DNA wurden 26 Hefetransformanden erhalten. Aus je 10 Hefetransformanden wurde Plasmid DNA präpariert (2.9.3) und *E.coli* HB101 mit Plasmid DNA transformiert (2.11.8). HB101 Transformanden wurden auf Ap^r selektioniert.

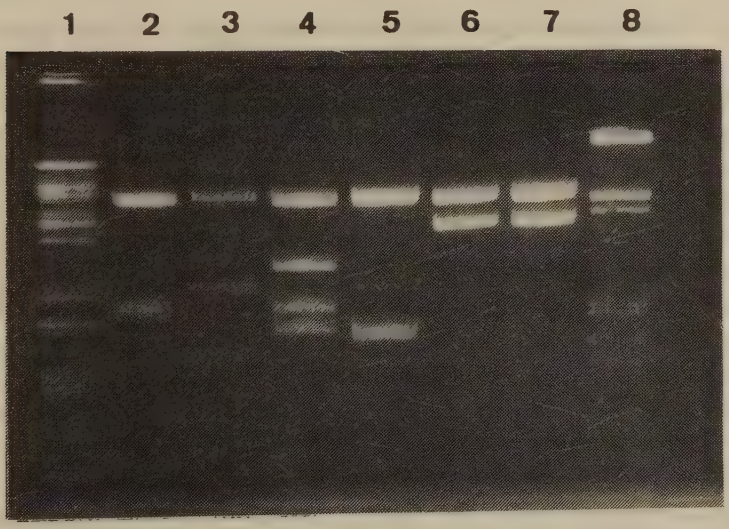


Abb. 6: Restriktionsanalyse der pURY Plasmide.
Die DNAs wurden nach Restriktionsverdau mit EcoRI in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

1 - DNA Größenstandard: λDNA (BstEII)
2 - pURY 126#1
3 - pURY 126#3
4 - pURY 126#8
5 - pURY 32#2
6 - pURY 32#3
7 - pURY 32#8
8 - DNA Größenstandard: λDNA (EcoRI + HindIII)

Mit je 3 Hefeplasmid DNA Präparationen wurden HB101 Transformanden erhalten. Die aus den HB101 Transformanden isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau mit EcoRI auf insertierte Fragmente getestet. Die Bezeichnung der Plasmide wurde in Anlehnung an die Plasmidnomenklatur für Hefe vorgenommen (Botstein et al., 1979): p für Plasmid, U für *Ustilago*, RY für Replikation in Yeast (Hefe).

Abb. 6 zeigt, daß in YIp5 EcoRI Fragmente unterschiedlicher Größe und teilweise mehr als ein EcoRI Fragment insertiert waren:

pURY 126#1 enthielt ein 2.2 kb EcoRI Fragment,
pURY 126#3 enthielt 2 EcoRI Fragmente (2.3 kb, 1.5 kb),
pURY 126#8 enthielt 3 EcoRI Fragmente (2.7 kb, 2.2 kb, 1.9 kb),
pURY 32#2 enthielt ein EcoRI Fragment (1.7 kb),
pURY 32#3
und pURY 32#8 enthielten ein EcoRI Fragment gleicher Größe (4 kb).

Die einzelnen EcoRI Fragmente aus pURY 126#3 und pURY 126#8 wurden, wie für *U.maydis* Gesamt DNA beschrieben, subkloniert. Fragmente mit ARS Aktivität wurden nach Transformation von Y220 ermittelt. ARS Aktivität besaßen das 2.3 kb EcoRI Fragment aus pURY 126#3 und das 2.2 kb EcoRI Fragment aus pURY 126#8. Die entsprechenden Plasmide wurden als pURY 126#3A und pURY 126#8B bezeichnet. Für pURY 32#3 und pURY 32#8 wurde gezeigt, daß das 4 kb EcoRI Fragment durch HindIII Verdau in Fragmente von 2.3 kb und 1.7 kb gespalten wird. Weitere Restriktionsanalysen (mit HincII, PstI) zeigten, daß beide Plasmide das gleiche *U.maydis* Fragment enthielten. Es wurde deshalb nur mit pURY 32#3 weitergearbeitet. Die EcoRI-HindIII Fragmente (2.3 kb, 1.7 kb) wurden in YIp5 kloniert und auf ARS Aktivität in Y220 getestet. Das 2.3 kb EcoRI-HindIII Fragment zeigte ARS Aktivität. Das entsprechende Plasmid wurde pURY 32#3A genannt.

3.2.1.2 Analyse der ARS Aktivität

Charakteristisch für Plasmide mit ARS Aktivität ist eine erhöhte Transformationseffizienz gegenüber dem ins Hefegenom integrierenden Vektor YIp5, Instabilität sowohl unter nichtselektiven als auch unter selektiven Bedingungen (im Vergleich zu Plasmiden, die den 2-micron Replikationsorigin besitzen) und

eine verlängerte Generationszeit der Hefetransformanden (Stinchcomb et al., 1980). Alle pURY Plasmide wurden auf diese Eigenschaften getestet.

Tab. 1 Vergleich der Transformationseffizienzen von YIp5, Yep24, YRp7 und pURY Plasmiden

Plasmid	Transformanden/µg DNA
YIp5	$< 10^1$
Yep24	1×10^4
YRp7	6×10^3
pURY 126#1	1×10^3
pURY 126#3	2×10^3
pURY 126#3A	2×10^3
pURY 126#8	2×10^3
pURY 126#8B	6×10^3
pURY 32#2	4×10^3
pURY 32#3	1×10^3
pURY 32#3A	1×10^3

Die in Tab. 1 aufgeführten Werte sind Durchschnittswerte aus mehr als zwei Hefetransformationen (2.11.7). Die Selektion erfolgte für YIp5, pURY Plasmide und Yep24 auf Uracil prototrophe Zellen, für YRp7 auf Tryptophan prototrophe Zellen. Als Kontrollplasmide dienten Yep24, das den 2-micron Replikationsorigin besitzt und YRp7, das als Replikationsorigin das ARS1 Element aus chromosomaler Hefe DNA benutzt.

Stabilität der Y220/pURY Stämme unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen

Unter selektiven Bedingungen (YNB (minus Uracil)) kultivierte Y220/pURY Stämme wurden 1:1000 in je 10 ml YNB (minus Uracil) und 10 ml YNB (plus Uracil) verdünnt. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 30°C inkubiert, dann wurden Verdünnungen auf YPD-Platten (Zellzahlkontrolle) und YNB-Platten (minus Uracil) (URA^+-Phänotypkontrolle) ausgestrichen.

Tab. 2 Stabilität der Y220/pURY Stämme unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen im Vergleich mit Y220/Yep 24

Plasmide Kulturmedium	pURY 126#1	pURY 126#3	pURY 126#8	pURY 32#2	pURY 32#3	Yep 24
YNB plus Uracil	4.4 %	3.2 %	5 %	9.8 %	1.8 %	66 %
YNB minus Uracil	20 %	12 %	17 %	20 %	4.6 %	60 %

Die aufgeführten Werte stammen aus einem Experiment und geben die unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen erhaltenen Uracil prototrophen Zellen in % der Gesamtzellzahl wieder.

Generationszeiten von Y220/pURY Stämmen im Vergleich mit Y220 und Y220/Yep 24

Unter selektiven Bedingungen (YNB (minus Uracil)) kultivierte Y220/pURY Stämme und Y220/Yep 24 wurden auf 1 x 10^6 Zellen/ml in YNB (minus Uracil) verdünnt. Die Zellen wurden bei 30°C geschüttelt, Aliquots werden in 30 Min. oder 60 Min. Abständen entnommen und der Zelltiter bestimmt (2.11.10). Für jeden Stamm wurde eine Wachstumskurve erstellt und daraus die Generationszeiten berechnet. Die Generationszeit von Y220, kultiviert in YNB plus Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin, betrug 60 Min. Für Y220/pURY126#1 ergab sich eine Generationszeit von 240 Min., für Y220/pURY126#3 von 170 Min., für pURY126#8 von 160 Min., für 32#2 von 260 Min., und für 32#3 von 120 Min.
Für Y220/Yep24 wurden mehrmals Wachstumskurven erstellt. Dabei variierte die Generationszeit zwischen 90 und 220 Min.

Die pURY Plasmide weisen die für ARS charakteristischen Merkmale auf:

- sie stimulieren eine erhöhte Transformationseffizienz von Hefezellen;
- sie lassen sich nach einer DNA Präparation aus Hefe in *E.coli* transformieren; sie liegen also in Hefezellen in nichtintegriertem Zustand vor;
- sie sind sowohl unter selektiven und auch unter nichtselektiven Bedingungen instabil;

- die Generationszeiten von Y220/pURY Stämmen sind im Vergleich mit der Generationszeit von Y220 verlängert.

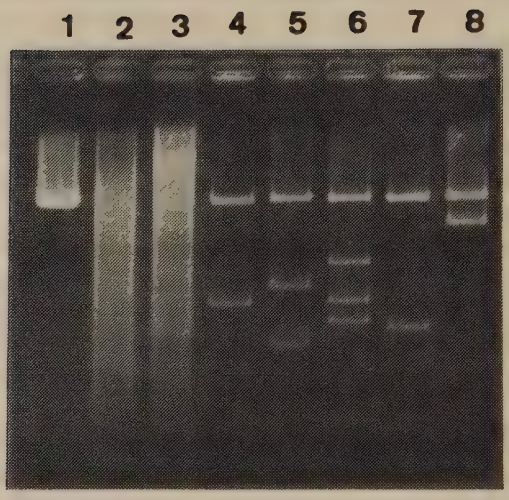
Bei weiteren Experimenten zur Identifizierung kleinerer Fragmente mit ARS Aktivität wurde auf die Erstellung von Wachstumskurven zur Generationszeitbestimmung verzichtet, da diese von Experiment zu Experiment, wie für Y220/Yep24 gezeigt, stark variiert und da ferner eine Korrelation von Instabilität und Verlängerung der Generationszeit besteht (Stinchcomb et al., 1980). Im Folgenden wurden als Kriterien für ARS Aktivität Instabilität unter selektiven als auch nichtselektiven Bedingungen und die erhöhte Transformationseffizienz von Hefezellen im Vergleich mit YIp5 gewertet.

3.2.1.3 Verwandtschaft zwischen ARS-Fragmenten aus *U.maydis*

Um festzustellen, ob die aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 DNA klonierten ARS-Fragmente spezifisch für den jeweiligen *U.maydis* Stamm sind, wurden die ARS-Fragmente aller pURY Plasmide mit Gesamt DNA aus *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 hybridisiert. Gleichzeitig wurden die ARS-Fragmente auf Kreuzhybridisierung getestet. Hierzu wurde EcoRI verdaute Gesamt DNA aus *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 und EcoRI gespaltene pURY Plasmid DNA elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA auf Nitrocellulosefilter transferiert (2.8.6). Die EcoRI ARS-Fragmente wurden isoliert (2.9.5) und anschliessend wie in 2.8.7 beschrieben mit ^{32}P markiert.

Ein Vergleich von Abb. 7B, D und E zeigt, daß die EcoRI ARS-Fragmente aus pURY126#1 (Spur 4), pURY126#8 (Spur 6) und pURY32#2 (Spur 7) miteinander hybridisieren. Wie in Abb. 7B zu sehen ist, hybridisiert das ARS-Fragment aus pURY126#1 (2.2 kb) mit einem Fragment gleicher Größe in Gesamt DNA aus *U.maydis* 126 und einem kleineren Fragment (ca. 1.7 kb) in *U.maydis* 32 DNA.

In Abb. 7D ist das Hybridisierungsverhalten des EcoRI ARS-Fragmentes aus pURY126#8 (2.2 kb) dargestellt. Es hybridisiert ebenfalls mit einem Fragment gleicher Größe in Gesamt DNA aus *U.maydis* 126 und einem kleineren Fragment (ca. 1.7 kb) in Gesamt DNA aus *U.maydis* 32. Aus Abb. 7E ist das Hybridisierungsverhalten des EcoRI ARS-



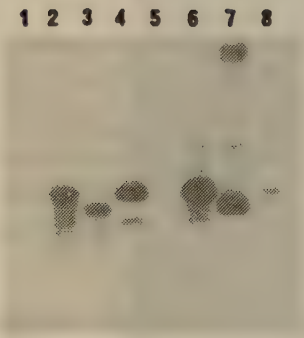
A

Abb. 7: Zuordnung der *U.maydis* ARS-Fragmente zu Gesamt DNA aus *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126, und Hybridisierungen der pURY Plasmide untereinander.

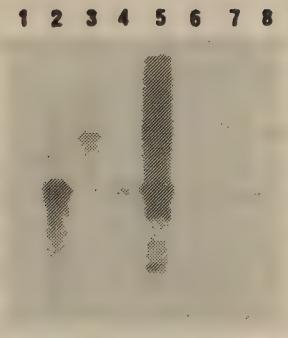
A) Alle DNA Proben wurden mit EcoRI gespalten und in 1.2 % Agarosegelen aufgetrennt.

B-G) Das in A) gezeigte Gel wurde 6 mal hergestellt, die DNA auf Nitrocellulose transferiert und mit den EcoRI ARS-Fragmenten aus pURY126#1 (B), aus pURY126#3 (C), aus pURY126#8 (D), aus pURY32#2 (E) und pURY32#3 (F) und mit YIp5 (G) hybridisiert (2.8.6 - 2.8.8). Die Waschbedingungen nach der Hybridisierung waren moderat.

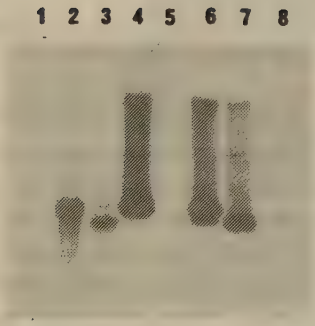
A-G) 1 - YIp5
2 - Gesamt-DNA aus *U.maydis* 126
3 - Gesamt-DNA aus *U.maydis* 32
4 - pURY126#1
5 - pURY126#3
6 - pURY126#8
7 - pURY32#2
8 - pURY32#3
9 - DNA Größenstandard: λDNA (HindIII)



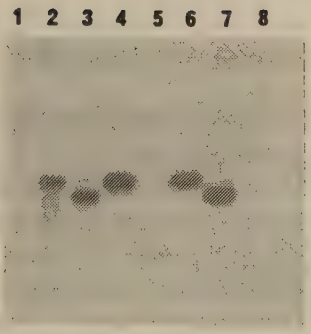
B



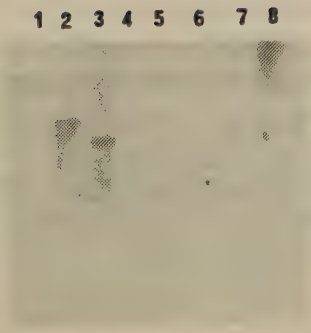
C



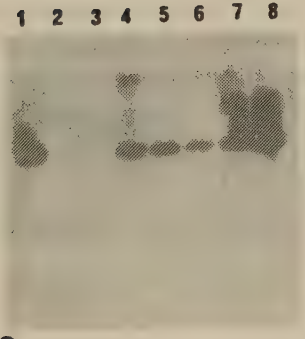
D



E



F



G

Fragments aus pURY32#2 (1.7 kb) zu entnehmen. Es hybridisiert mit einem Fragment gleicher Größe in Gesamt DNA aus *U.maydis* 32 und einem größeren Fragment (ca. 2.2 kb) in Gesamt DNA aus *U.maydis* 126.

Das EcoRI ARS-Fragment aus pURY126#3 (2.3 kb) hybridisiert, wie in Abb. 7C dargestellt, mit einem Fragment gleicher Größe in Gesamt DNA aus *U.maydis* 126 und mit einem größeren Fragment (> 4 kb) in DNA aus *U.maydis* 32. Es zeigt keine Hybridisierung mit den anderen EcoRI ARS-Fragmenten.

In Abb. 7E sind die Hybridisierungssignale mit dem 4.0 kb EcoRI ARS-Fragment aus pURY32#3 ersichtlich. Es hybridisiert mit einem gleich großen Fragment in der DNA aus *U.maydis* 32 und einem grösseren Fragment (> 5 kb) in der Gesamt DNA aus *U.maydis* 126. Es zeigt keine Hybridisierung mit den anderen EcoRI ARS-Fragmenten.

YIp5 (Abb. 7G) zeigt auch nach Langzeitexposition keine Hybridisierung mit Gesamt DNA aus *U.maydis* 32 und 126.

Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, daß die 2.2 kb EcoRI ARS-Fragmente aus pURY126#1 und pURY126#8 identisch sind. Somit wurde dieses ARS-Fragment zweimal unabhängig voneinander kloniert. Mit allen ARS-Fragmenten konnte ein Restriktionspolymorphismus der DNA aus *U.maydis* 126 und 32 aufgezeigt werden. Restriktionspolymorphismen sind bei diversen Pilzarten beschrieben worden (Collins und Lambowitz, 1983; Garber und Yoder , 1984; McArthur und Clark-Walker, 1983; Hintz et al., 1985). Die unterschiedlich großen, kreuzhybridisierenden EcoRI ARS-Fragmente aus pURY126#1 (pURY126#8) und pURY32#2 sind Träger des EcoRI-Restriktionspolymorphismus von *U.maydis* 32 und 126.

3.2.1.4 Zuordnung der DNA Fragmente mit ARS-Aktivität zu mitochondrialer oder chromosomaler DNA aus *U.maydis*

Mit der von Schulz (1986) entwickelten Methode, mitochondriale und chromosomale DNA aus *U.maydis* im neutralen CsCl-Dichtegradienten zu trennen, war es möglich, die ARS-Fragmente aus *U.maydis* einer DNA Fraktion zuzuordnen.

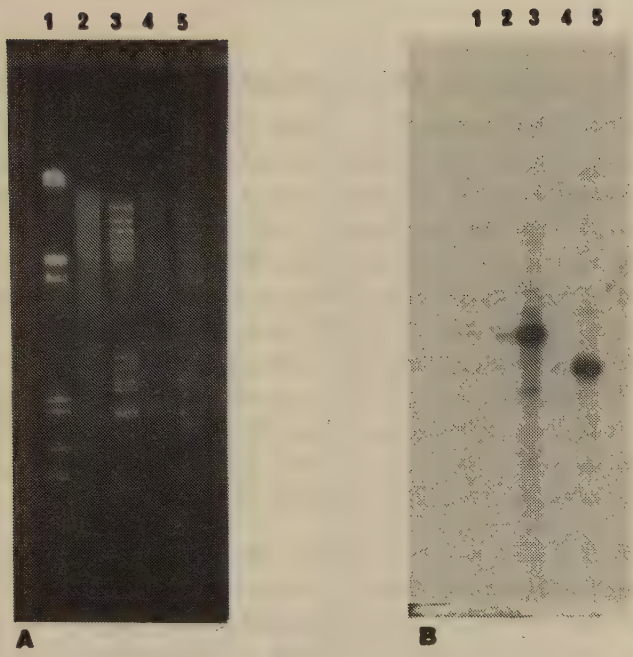


Abb. 8: Zuordnung des EcoRI ARS-Fragments aus pURY32 zu mitochondrialer oder chromosomaler DNA aus *U.maydis*.

A) Restriktionsverdau mit EcoRI. Die Fragmente wurden in einem 1.2 % Agarosegel aufgetrennt.

B) Die in A) gezeigte DNA wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit dem EcoRI ARS Fragment aus pURY32#2 hybridisiert (2.8.6 - 2.8.8). Die Waschbedingungen nach der Hybridisierung waren stringent.

(A); B) 1 - DNA-Größenstandard: λDNA (EcoRI + HindIII)
2 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 126
3 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 126
4 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 32
5 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 32

Stellvertretend für das Hybridisierungsverhalten aller EcoRI ARS-Fragmente der pURY-Plasmide ist in Abb. 8 die Hybridisierung des ARS-Fragmentes (1.75 kb) aus pURY32#2 dargestellt. Es zeigt das typische, stammspezifische Hybridisierungsmuster ausschließlich mit mitochondrialer DNA aus *U.maydis*. Mit vergleichbaren Hybridisierungsexperimenten wurde gezeigt, daß alle in YIp5 klonierten *U.maydis* ARS-Fragmente mitochondrialen Ursprungs sind.

3.2.1.5 Isolierung von chromosomalen *U.maydis* ARS Sequenzen

Da bei der Klonierung von *U.maydis* Gesamt DNA und anschließender Selektion auf ARS nur Sequenzen mitochondrialen Ursprungs isoliert wurden, wurde die nach Schulz (1986) präparierte chromosomale DNA Fraktion aus *U.maydis* 126 (ch 126) und *U.maydis* 32 (ch 32) zur Klonierung von chromosomalen ARS-Fragmenten benutzt. Die Klonierungs- und Isolierungsstrategie erfolgte wie unter 3.2.1.1. beschrieben. Es wurden 39 Y220/YIp5-ch126 Klone und 19 Y220/YIp5-ch32 Klone erhalten. Aus je 10 Hefeklonen wurde Plasmid DNA isoliert (2.9.3) und zur Transformation von *E.coli* DH5 verwendet. 6 Hefe Plasmidpräparationen von Y220/YIp5-ch126 führten nach Transformation zu Ap^r DH5 Klonen. Nur 1 Hefe Plasmidpräparation aus Y220/YIp5-ch32 führte nach Transformation zu Ap^r DH5 Klonen.

Restriktionsanalysen der Plasmid DNAs zeigten, daß,mit einer Ausnahme, alle erhaltenen Plasmide etwa 2 kb kleiner als der YIp5 Vektor waren. Das eine Plasmid hatte ein 2.3 kb EcoRI Fragment in YIp5 insertiert. Es wurde pURY126K5 genannt.

Wiederholte Transformationen von DH5 mit Hefe Plasmid DNA waren entweder nicht erfolgreich oder führten wieder zu kleineren Plasmiden. Um nachzuweisen, daß autonom replizierende Plasmide in den Hefe Transformanden vorlagen, wurden diejenigen Y220/YIp5-ch Stämme, aus denen Plasmid DNA zur Transformation von DH5 isoliert worden war, auf Stabilität des Uracil-Phänotyps unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen getestet (s. 3.2.1.2).

Alle in Tab. 3 aufgeführten Y220/YIp5-ch Stämme zeigten die für ARS Plasmide charakteristische Instabilität. Auffällig ist die erhöhte Instabilität von Y220/YIp5-ch8, Y220/YIp5-ch9 und Y220/YIp5-ch10 unter den getesteten Bedingungen (Tab. 3). Die Transformationseffizienz (6×10^3 Transformanden/µg DNA) und die relative Instabilität unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen (Tab. 3) wiesen pURY126K5 als ARS Plasmid aus. Ist das EcoRI Fragment aus pURY126K5 mitochondrialen oder chromosomalen Ursprungs? Diese Frage wurde durch Hybridisierung des EcoRI Fragments mit auf Nitrocellulose transferierter DNA aus *U.maydis* 32 und 126 beantwortet.

Tab. 3 Stabilität von Y220/YIp5-ch Stämmen unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen im Vergleich zu Y220/Yep24

Plasmide [a]	YIp5-ch1	YIp5-ch2	YIp5-ch3	YIp5-ch4	pURY26K5	YIp5-ch6	YIp5-ch7	YIp5-ch8	YIp5-ch9	YIp5-ch10	
Kultur-medium											Yep24
YNB plus Uracil	0.02 % [b]	0.05 %	0.4 %	0.3 %	0.7 %	0.3 %	0.04 %	0.2 %	0.04 %	0.1 %	20 %
YNB minus Uracil	4 %	23 %	5.4 %	3.5 %	17 %	3.6 %	5 %	0.7 %	0.4 %	0.3 %	25 %

a) Alle Plasmide befanden sich in dem Hefestamm Y220

b) Die Werte beziehen sich auf ein Experiment und geben die unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen erhaltenen $URA3^+$ Kolonien in % der Gesamtkolonien wieder.

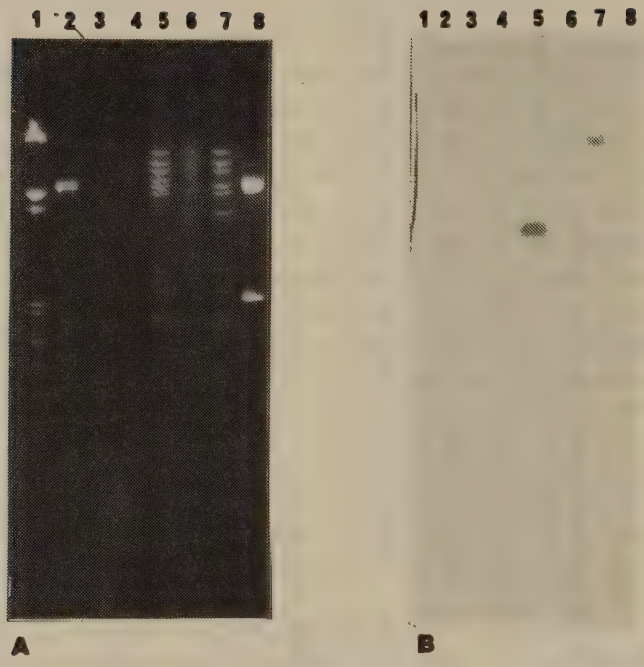


Abb. 9: Zuordnung des EcoRI Fragments aus pURY126K5 zu mitochondrialer oder chromosomaler *U.maydis* DNA.

A) Restriktionsverdau mit EcoRI. Die Fragmente wurden in einem 1.2 % Agarosegel aufgetrennt.

B) Die in A) gezeigte DNA wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit dem EcoRI ARS-Fragment aus pURY126K5 hybridisiert (2.8.6 - 2.8.8). Die Waschbedingungen nach der Hybridisierung waren stringent.

(A); B) 1 - DNA-Größenstandard: λDNA (EcoRI + HindIII)
2 - YIp5
3 - --
4 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 126
5 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 126
6 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 32
7 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 32
8 - pURY126#1

Das EcoRI ARS-Fragment (2.3 kb) aus pURY126K5 hybridisiert mit einem Fragment gleicher Größe (2.3 kb) in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 126 und mit einem größeren Fragment (> 5 kb) in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 32 (Abb. 9B). Nach Langzeitexposition (72 Stunden) waren in der chromosomalen DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 Hybridisierungssignale mit Fragmenten gleicher Größe zu erkennen. Diese Hybridisierungssignale wiesen darauf hin, daß die zur Klonierung verwendete chromosomale *U.maydis* DNA geringfügig mit mitochondrialer DNA kontaminiert war (s.a. Abb. 8B).

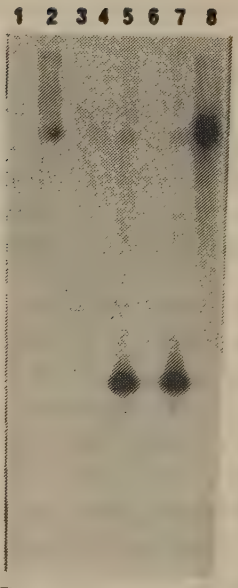
Mit dem ARS-Fragment aus pURY126K5 wurde in Hybridisierungen der bereits bekannte Restriktionspolymorphismus für mitochondriale DNA aus *U.maydis* 32 und *U.maydis* 126 nachgewiesen. Es verhält sich im Hybridisierungsexperiment wie das ARS-Fragment (2.3 kb) aus pURY126#3 (Abb. 7C). Das Hybridisierungsverhalten und die Größe des ARS-Fragmentes (2.3 kb) lassen den Schluß zu, daß in pURY126K5 und pURY126#3 dasselbe EcoRI ARS-Fragment aus *U.maydis* 126 mitochondrialer DNA in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten kloniert wurde.

1983a wurde von G.R. Banks die Klonierung chromosomaler ARS-Fragmente aus *U.maydis* beschrieben. Dr. Banks überließ mir freundlicherweise die von ihm konstruierten Plasmide. Die Größe der von ihm klonierten EcoRI Fragmente mit ARS-Aktivität war von ihm für pURY1 mit 1.1 kb, für pURY2 mit 1.7 kb und für pURY19-6 mit 1.2 kb angegeben. Das von mir aus SF8 Klonen isolierte pURY1 wies im Gegensatz dazu nur ein 0.6 kb großes EcoRI Fragment auf. Da die Größenangaben voneinander abwichen, wurde pURY1 auf ARS-Aktivität getestet. Es erhöht die Transformationseffizienz von Y220 im Vergleich mit YIp5 um das 3000fache.

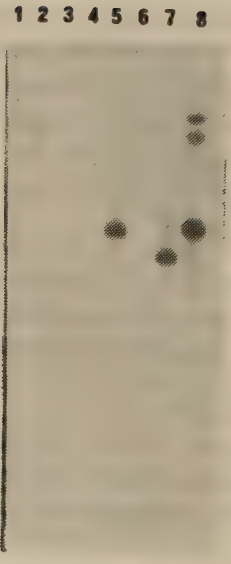
Mit Hybridisierungsanalysen sollte geklärt werden, ob die von Banks (1983a) isolierten ARS-Fragmente seines Ausgangsstammes (*U.maydis* 521AB) mit chromosomaler DNA aus *U.maydis* 126 und/oder *U.maydis* 32 hybridisieren.

Das 0.6 kb EcoRI ARS-Fragment aus pURY1 hybridisiert mit einem > 0.6 kb Fragment in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 (Abb. 10B). Das 1.7 kb EcoRI ARS-Fragment aus pURY2

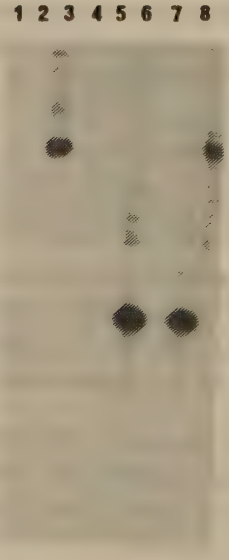
A



B



C



D

Abb. 10: Zuordnung der EcoRI ARS-Fragmente aus pURY1, pURY2 und pURY19-6 (Banks, 1983a) zu mitochondrialer oder chromosomaler DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32.

A) Restriktionsverdau mit EcoRI. Die DNAs wurden in 1.2 % Agarosegelen aufgetrennt.

B-D) Das in A) gezeigte Gel wurde dreimal hergestellt, die DNA auf Nitrocellulose transferiert und mit EcoRI ARS-Fragment aus pURY1 (B), aus pURY2 (C) und pURY19-6 (D) hybridisiert (2.8.6 - 2.8.8). Die Waschbedingungen nach der Hybridisierung waren stringent.

A-D) 1 - DNA Größenstandard: λDNA (EcoRI + HindIII)
2 - YIp5
3 -
4 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 126
5 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 126
6 - Chromosomale DNA aus *U.maydis* 32
7 - Mitochondriale DNA aus *U.maydis* 32

(Abb. 10C) hybridisiert mit einem 2.2 kb Fragment in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 126. Es hybridisiert außerdem mit einem 1.7 kb Fragment in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 32 und mit dem EcoRI ARS-Fragment aus pURY126#1. Das 1.2 kb EcoRI ARS-Fragment aus pURY19-6 hybridisiert mit einem 1.2 kb Fragment in mitochondrialer DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 (Abb. 10D). Mit dem EcoRI ARS-Fragment aus pURY2 wurde der für pURY126#1 und pURY32#2 typische Restriktionspolymorphismus für mitochondriale DNA aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 nachgewiesen. Das Hybridisierungsverhalten von pURY2 und die Größe des ARS-Fragmentes läßt den Schluß zu, daß pURY2 und pURY32#2 identisch sind. Wie durch die Hybridisierungsergebnisse gezeigt, sind alle von G.R. Banks (1983a) isolierten ARS-Fragmente nicht chromosomalen, sondern mitochondrialen Ursprungs.

3.2.1.6 Subklonierung und Sequenzanalyse von verkürzten ARS-Fragmenten aus pURY126#1, pURY32#2 und pURY32#3A

Detailliertere Analysen der Struktur von ARS1 aus Hefe (Stinchcomb et al., 1981; Celnicker et al., 1984) zeigten, daß die autonom replizierende Sequenz in zwei oder drei funktionelle Domänen gegliedert ist. Die eine Domäne (A) erlaubt "high frequency transformation" mit nur geringer autonomer Replikation. Die Domäne B stimuliert die Replikation wenn Domäne A vorhanden

ist, erlaubt jedoch allein keine autonome Replikation. Durch Sequenzvergleich mehrerer ARS-Fragmente aus Hefe wurde eine mit der Domäne A assoziierte ARS Konsensus-Sequenz ermittelt. Die Konsensus-Sequenz ist $^{A}/_{T}$ TTTAT $^{A}/_{G}$ TTT $^{A}/_{T}$ (Broach et al., 1983).

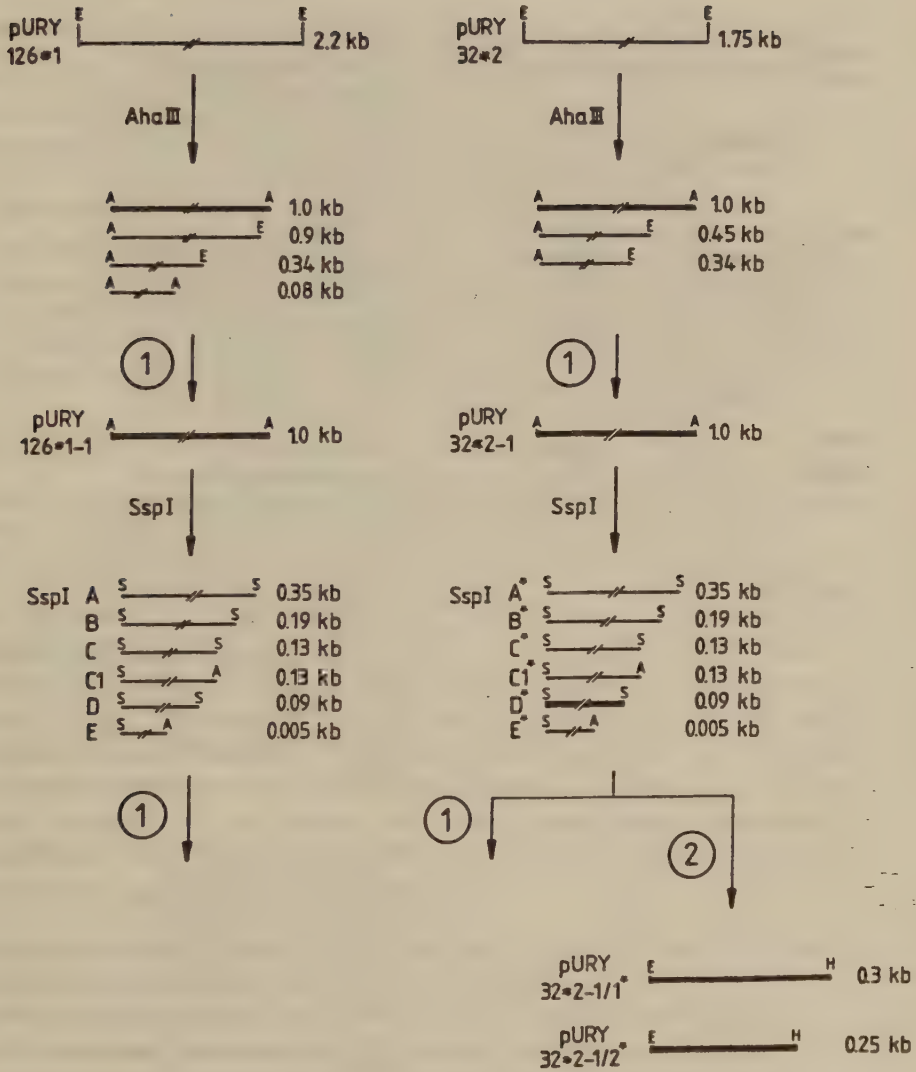
Um die Basensequenz von ARS-Fragmenten aus *U.maydis* zu analysieren, wurden die ARS Aktivität von drei Fragmenten auf kürzere DNA Bereiche eingeengt. Die ARS-Fragmente aus pURY126#1, pURY32#2 und pURY32#3A wurden hierzu ausgewählt.

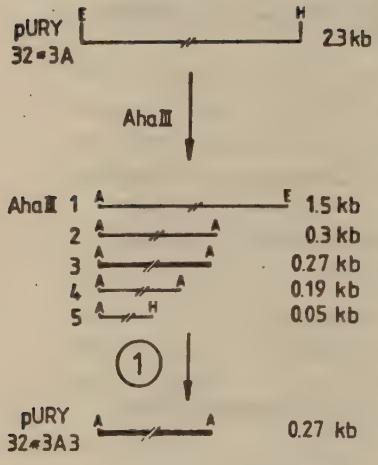
Verkürzung der ARS-Fragmente

Die pURY Plasmide wurden zur Charakterisierung kleinerer klonierbarer DNA Fragmente mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Mit den Restriktionsendonukleasen AhaIII, HpaII, HinfI und TaqI ließen sich die ARS-Fragmente in mehrere $\leq$ 1 kb Fragmente spalten. Zur Klonierung kürzerer ARS-Fragmente wurden die durch AhaIII, AhaIII + EcoRI und AhaIII + HindIII erzeugten Fragmente benutzt, da sich diese Fragmente ohne Modifizierung (Auffüllen oder Abbau überstehender 3'- oder 5'-DNA Enden) verwenden ließen.

In Abb. 11 ist die Klonierungsstrategie für verkürzte ARS-Fragmente aus pURY126#1, pURY32#2 und pURY32#3A dargestellt. Alle Klonierungen erfolgten über eine Zwischenklonierung der Fragmente in den Polylinker von M13mp9. Diese Lösung wurde gewählt, weil YIp5 keine geeignete Klonierungsstelle für Fragmente mit glatten Enden besitzt. Die Zwischenklonierung in M13mp9 hat den Vorteil, daß alle anschließend aus M13mp9 isolierten Fragmente dieselben Fragmentenden (EcoRI - HindIII) besitzen. Außerdem können ausgewählte Fragmente direkt sequenziert werden. Alle über die Zwischenklonierung entstandenen EcoRI-HindIII Fragmente wurden in YIp5 kloniert und anschliessend auf erhöhte Transformation von Y220 im Vergleich mit YIp5 getestet. ARS Aktivität besaßen die in YIp5 insertierten 1 kb AhaIII Fragmente aus pURY126#1 und pURY32#2 und das 0.27 kb AhaIII Fragment aus pURY32#3A. Die Plasmide wurden pURY126#1-1, pURY32#2-1 und pURY32#3A3 genannt.

Wie in Abb. 11 dargestellt, wurde versucht, die ARS Aktivität von pURY126#1-1 und pURY32#2-1 kürzeren Fragmenten zuzuordnen.


pURY 126*1
2.2 kb
AhaIII
1.0 kb
0.9 kb
0.34 kb
0.08 kb
1
pURY 126*1-1
1.0 kb
SspI
SspI A 0.35 kb
B 0.19 kb
C 0.13 kb
C1 0.13 kb
D 0.09 kb
E 0.005 kb
1
pURY 32*2
1.75 kb
AhaIII
1.0 kb
0.45 kb
0.34 kb
1
pURY 32*2-1
1.0 kb
SspI
SspI A* 0.35 kb
B* 0.19 kb
C* 0.13 kb
C1* 0.13 kb
D* 0.09 kb
E* 0.005 kb
1
2
pURY 32*2-1/1*
0.3 kb
pURY 32*2-1/2*
0.25 kb



URA$^+$ Kolonien/µg Plasmid		
pURY126∗1	pURY32∗2	pURY32∗3A
∿ 1 x 10^3	∿ 1 x 10^3	∿ 1 x 10^3

Stabilität des URA$^+$ Phänotyps			
Kulturmedium \ Y220 Stamm	pURY126∗1	pURY32∗2	pURY32∗3A
YNB + Uracil	7 %	5 %	51 %
YNB - Uracil	18 %	20 %	93 %

URA$^+$ Kolonien/µg Plasmid		
pURY126∗1.1	pURY32∗2.1	pURY32∗3A3
2 x 10^3	3 x 10^3	2 x 10^3

Stabilität des URA$^+$ Phänotyps			
Kulturmedium \ Y220 Stamm	pURY126∗1-1	pURY32∗2-1	pURY32∗3A3
YNB + Uracil	1.6 %	1.2 %	1 %
YNB - Uracil	6.5 %	14 %	13 %

URA$^+$ Kolonien/µg Plasmid	
pURY32∗2-1/1	pURY32∗2-1/2
1-2 x 10^3	1-2 x 10^3

Stabilität des URA$^+$ Phänotyps		
Kulturmedium \ Y220 Stamm	pURY32∗2-1/1	pURY32∗2-1/2
YNB + Uracil	0.1 %	0.7 %
YNB - Uracil	1.7 %	2.4 %

Abb. 11: Plasmide mit verkürzten *U.maydis* ARS-Fragmenten: Konstruktion der Plasmide und Analyse der ARS Aktivität.

Derivate der EcoRI ARS-Fragmente (aus pURY126#1 und pURY32#2) und des EcoRI-HindIII ARS-Fragmentes (aus pURY32#3A) wurden nach Spaltung mit AhaIII (A) und SspI (S) wie folgt subkloniert:

1. Die Spaltprodukte wurden in M13mp9 (HincII , HincII + EcoRI, HincII + HindIII) kloniert, die replikative Form aus JM103 isoliert, die klonierten Fragmente wurden nach Spaltung mit EcoRI + HindIII isoliert und in YIp5 (EcoRI + HindIII) kloniert.
2. Das 1 kb AhaIII ARS-Fragment wurde als EcoRI - HindIII Fragment aus YIp5 isoliert, die Fragmentenden wurden aufgefüllt (2.10). Dieses Fragment wurde partiell mit SspI verdaut, die Fragmentpopulation wurde in M13mp9 (HincII) kloniert. Aus 10 JM103 Klonen wurde die replikative Form isoliert, die klonierten Fragmente mit EcoRI + HindIII ausgeschnitten und in YIp5 (EcoRI + HindIII) kloniert.

* Diese Fragmente wurden sequenziert.

Alle in YIp5 klonierten EcoRI-HindIII Fragmente wurden auf erhöhte Transformationseffizienz von Y220, im Vergleich mit YIp5 getestet. ARS Aktivität ließ sich höchstens einem Subfragment zuordnen. Für das jeweilige Plasmid wurden die Transformationseffizienz und der URA3$^+$ Phänotypverlust (siehe 3.2.1.2) bestimmt.

Durch Spaltung mit SspI entstanden aus den EcoRI - HindIII ARS-Fragmenten aus pURY126#1-1 und pURY32#2-1 jeweils 6 Fragmente. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, ist das SspI Bandenmuster der ARS-Fragmente aus pURY126#1-1 und pURY32#2-1 identisch. Der Restriktionspolymorphismus der Ausgangsfragmente liegt somit nicht in DNA Bereichen mit ARS Aktivität. Ferner zeigt dieses Experiment eindeutig, daß identische AhaIII Fragmente aus *U.maydis* 126 und *U.maydis* 32 ARS Aktivität besitzen.

Alle durch SspI, SspI + HindIII und SspI + EcoRI erzeugten Fragmente wurden einzeln kloniert (Abb. 11) und auf ARS Aktivität durch Transformation von Y220 getestet. Kein Fragment zeigte ARS Aktivität. Wenn durch Restriktion mit SspI die Domänenstruktur von ARS-Fragmenten (Stinchcomb et al., 1981; Celniker et al., 1984) zerstört wurde, sollte es möglich sein, durch Klonierung von partiell SspI gespaltener DNA den Bereich zu finden, der ARS Aktivität vermittelt und stabilisiert. Mit

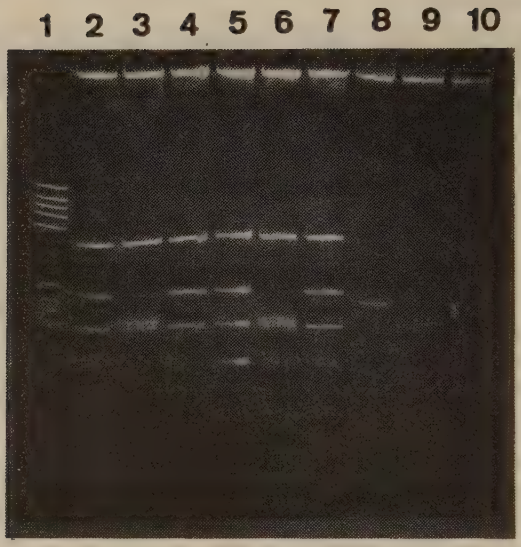


Abb. 12: Restriktionsverdau von pURY126#1-1, pURY32#2-1, YIp5 mit SspI, SspI + EcoRI, SspI + HindIII.

Die Fragmente wurden in einem gemischten Agarose/ Acrylamidgel (2.8.3) aufgetrennt.

1 - DNA Größenstandard pBR322 (HaeIII)
2 - pURY32#2-1 (SspI + HindIII)
3 - pURY32#2-1 (SspI + EcoRI)
4 - pURY32#2-1 (SspI)
5 - pURY126#1-1 (SspI + HindIII)
6 - pURY126#1-1 (SspI + EcoRI)
7 - pURY126#1-1 (SspI)
8 - YIp5 (SspI + HindIII)
9 - YIp5 (SspI + EcoRI)
10 - YIp5 (SspI)

dieser Klonierungsstrategie entstanden die Plasmide pURY32#2-1/1 und pURY32#2-1/2 (Abb. 11).

Vergleicht man die in Abb. 11 dargestellten Transformationseffizienzen ($URA3^+$ Kolonien/µg DNA) von Plasmiden mit verkürzten ARS-Fragmenten aus pURY32#2-1/1, pURY32#2-1/2, pURY32#2-1 untereinander und mit der Transformationseffizienz des Ausgangsplasmids pURY32#2, so war keine signifikante Änderung festzustellen.

Dies gilt auch für die Transformationseffizienz von pURY126#1 und pURY126#1-1. Deutlich verändert hat sich dag gen die Stabilität der pURY Plasmide in einer Hefepopulation (Abb. 11). Die Ausgangsplasmide pURY126#1, pURY32#2 und pURY32#3A waren unter nichtselektiven Bedingungen deutlich stabiler als Plasmide mit verkürzten ARS-Fragmenten. Es fällt besonders die Stabilität von pURY32#3A unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen auf. Y22O/pURY32#3A Stämme verhielten sich in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Bezug auf den Verlust ihres URA^+ Phänotyps gleich. Sowohl unter selektiven als auch nichtselektiven Bedingungen liegt eine höhere Stabilität des URA^+ Phänotyps in der Y22O/pURY32#3A Population vor als die mit anderen pURY Plasmiden erreichte Stabilität. Y22O/pURY32#3A Stämme zeigten ähnliches Verhalten wie Y22O/Yep24 Stämme (selektive Kulturbedingung: 6O % URA^+, nichtselektive Kulturbedingung: 66 % URA^+).

Die relativ hohe Stabilität von pURY32#3A sinkt bei Klonierung des verkürzten ARS-Fragmentes auf die für pURY126#1-1 und pURY32#2-1 gezeigte Stabilität. Auf dem EcoRI - HindIII Fragment (pURY 32#3A) muß sich ein Bereich befinden, der den Erhalt des Plasmids in einer Population stabilisiert. Die Instabilität der Plasmide mit verkürzten ARS-Fragmenten (pURY32#2-1/1 und pURY32#2-1/2) nimmt mit abnehmender Fragmentlänge drastisch zu.

DNA-Sequenzanalyse

Die Nukleotidsequenzen von Fragmenten mit ARS Aktivität (Abb. 11) (pURY32#2-1/1 und pURY32#2-1/2 und pURY32#2-1) wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1981) (2.8.5) ermittelt.

Aus der Sequenz (Abb. 13) geht hervor, daß das 299 bp EcoRI - HindIII Fragment jeweils eine Erkennungssequenz für SspI und AhaIII enthält. Die entsprechenden Restriktionsfragmente wurden jedoch nie gefunden. Es fällt auf, daß die Erkennungssequenzen für AhaIII und SspI in einer palindromischen Sequenz liegen, die potentiell einen "Hairpin" ausbilden kann. Diese Struktur verhindert möglicherweise die Erkennung der jeweiligen Schnittstellen.

Für das ARS-Fragment aus pURY32#3A3 wurde eine Sequenz, die Homologie zur ARS Konsensussequenz aufweist, bestimmt. Das ARS-Fragment aus pURY32#2-1/1 (Abb. 15) entstand durch Ligation nicht benachbarter SspI-Fragmente. Es ist ein aus den SspI-Fragmenten C1, D und E von pURY32#2-1 (Abb. 14) zusammengesetztes Fragment. Das ARS-Fragment aus pURY32#2-1/2 (Abb. 16) entstand durch Ligation der SspI Fragmente D und C (Abb. 14). Im Gegensatz zur Anordnung von D und C im ARS-Ausgangsfragment (pURY32#-1/2) , liegen D und C in pURY32#2-1/2 invertiert vor. Die Inversion beider Fragmente erfolgte unabhängig voneinander.

Ein Vergleich der ARS-Fragmente aus pURY32#2-1/1 (Abb. 15) und pURY32#2-1/2 (Abb. 16) ergibt, daß beide Fragmente das SspI Fragment D enthalten, in dem die Sequenz (**) liegt, die Homologie zur ARS Konsensussequenz (Broach et al., 1983.) aufweist.

```
     E          ggggatccgtcAAAGAAGTAGT
gcttaagggccgcctaggcagTTTCTTCATCA
          10        20        30

ACTTATGATGAATAATGGTAAACACCTTAG
TGAATACTACTTATTACCATTTGTGGAATC
     40        50        60

TCCATTTCTACAAATCCTAGAACTATGTTA
AGGTAAAGATGTTTAGGATCTTGATACAAT
     70        80        90

CTTTACTAATGATACTACACGACGTACTCT
GAAATGATTAGTATGATGTGCTGCATGAGA
    100       110       120

                          A
AGATACTAAAAAAAGCTATTCTTGATAAAAT
TCTATGATTTTTTCGATAAGAACTATTTTA
    130       140       150
     S
TTTATAATAAGTTCGGATTTGTACAATTTG
AAATATTATTCAAGCCTAAACATGTTAAAC
    160       170       180

AACCTATTATTGAATCTAATCTAAGTAAAC
TTGGATAATAACTTAGATTAGATTCATTTG
    190       200       210

CTAATTCAAATCCTATTAATAATGATTATA
GATTAAGTTTAGGATAATTATTACTAATAT
    220       230       240

TGGTAGGACTAGTTGATGGTGATGGTAGCT
ACCATCCTGATCAACTACCACTACCATCGA
    250       260       270
 *********                 H
TTAACTTTGGATTTacctgc.agccaagcttg
AATTGAAACCTAAA
    280       290
```

Abb. 13: Basensequenz des 299 bp EcoRI-HindIII ARS-Fragments aus pURY32#3A3.

EcoRI Erkennungssequenz (E), HindIII Erkennungssequenz (H), AhaIII Erkennungssequenz (A), SspI Erkennungssequenz (S).
Sequenzen, die Homologien zur ARS Konsensussequenz (Broach et al., 1983) aufweisen, sind mit *** gekennzeichnet. Vektorsequenzen sind mit Kleinbuchstaben bezeichnet. Die Basensequenz eines DNA Stranges wurde aus dem M13mp9 Zwischenvektor von pURY32#3A3 bestimmt. Für die Sequenzanalyse des zweiten Stranges wurde das EcoRI-HindIII Fragment in M13mp8 (EcoRI + HindIII) umkloniert.

Abb.14

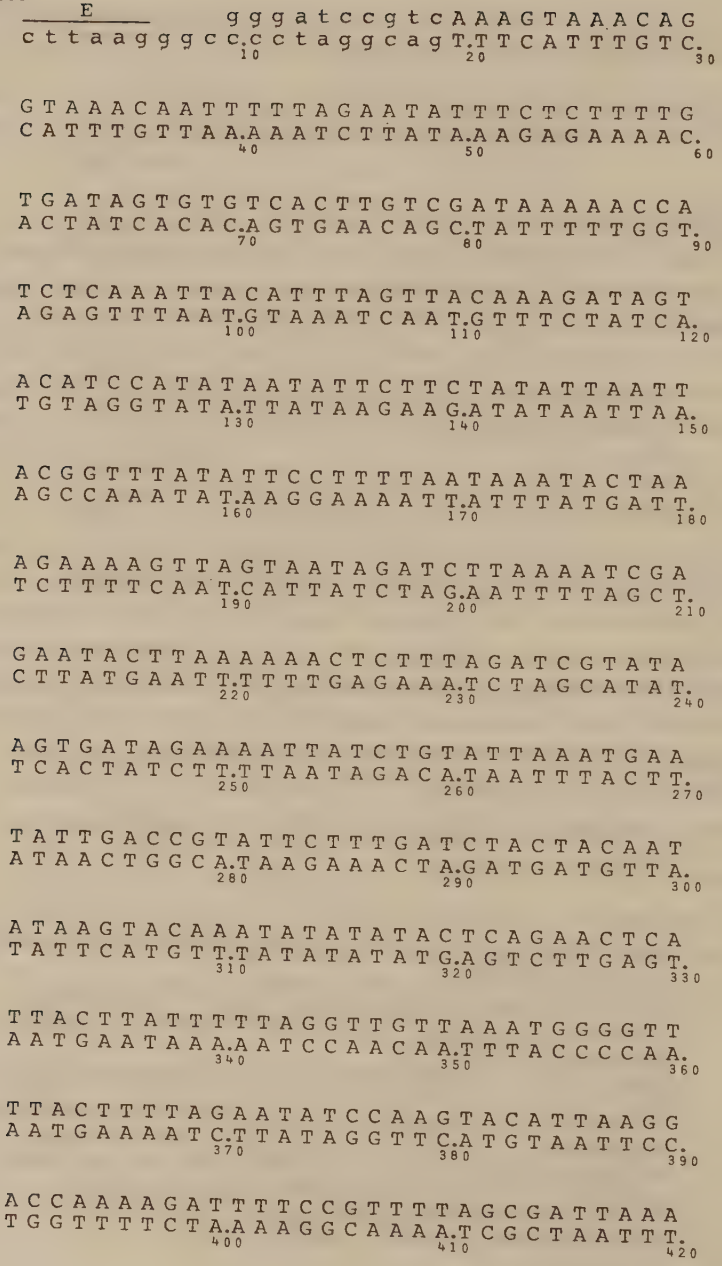
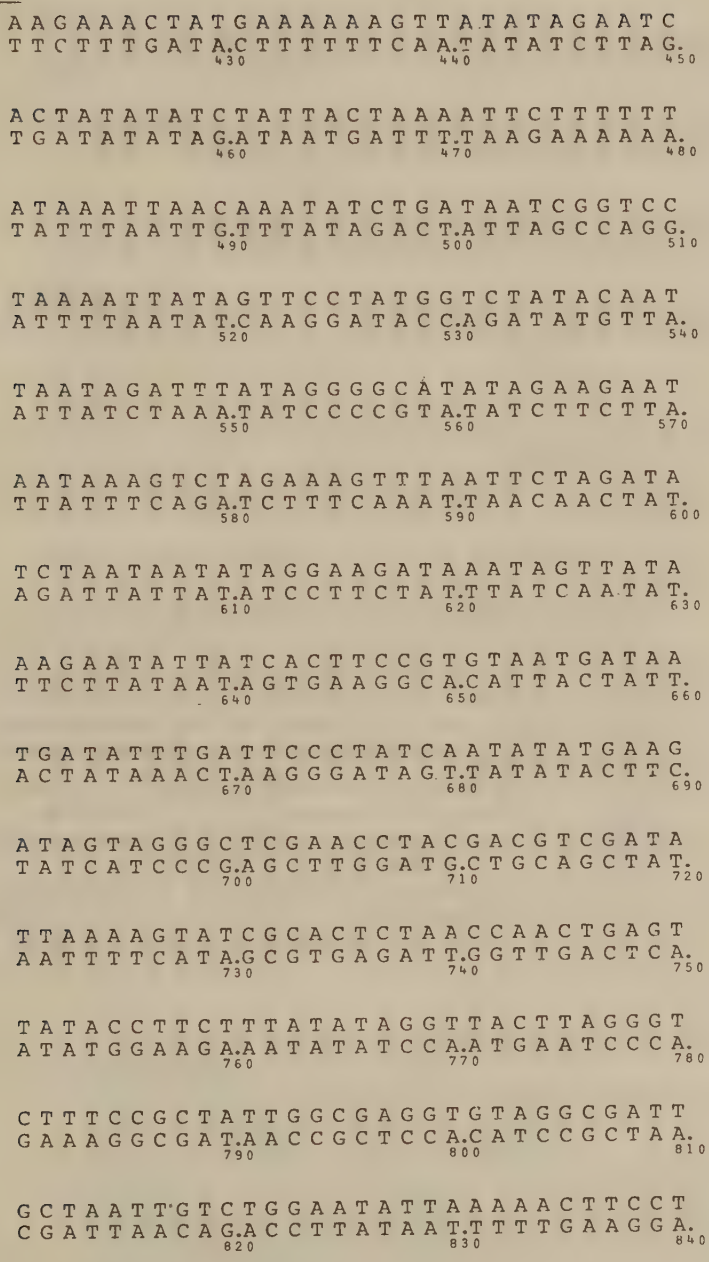

E
gggatccgtcAAAGTAAACAG
cttaagggccctaggcagTTTCATTTGTC
10 20 30
GTAAACAATTTTTAGAATATTTCTCTTTTG
CATTTGTTAAAAATCTTATAAAGAGAAAAC
40 50 60
TGATAGTGTGTCACTTGTCGATAAAAACCA
ACTATCACACAGTGAACAGCTATTTTTGGT
70 80 90
TCTCAAATTACATTTAGTTACAAAGATAGT
AGAGTTTAATGTAAATCAATGTTTCTATCA
100 110 120
ACATCCATATAATATTCTTCTATATTAATT
TGTAGGTATATTATAAGAAGATATAATTAA
130 140 150
ACGGTTTATATTCCTTTTAATAAATACTAA
AGCCAAAATATAAGGAAAATTATTTATGATT
160 170 180
AGAAAAGTTAGTAATAGATCTTAAAATCGA
TCTTTTCAATCATTATCTAGAATTTTAGCT
190 200 210
GAATACTTAAAAAACTCTTTAGATCGTATA
CTTATGAATTTTTGAGAAAATCTAGCATAT
220 230 240
AGTGATAGAAAATTATCTGTATTAAATGAA
TCACTATCTTTAATAGACATAATTTACTT
250 260 270
TATTGACCGTATTCTTTGATCTACTACAAT
ATAACTGGCATAAGAAACTAGATGATGTTA
280 290 300
ATAAGTACAAATATATATACTCAGAACTCA
TATTCATGTTTATATATATGAGTCTTGAGT
310 320 330
TTACTTATTTTTAGGTTGTTAAATGGGGTT
AATGAATAAAAATCCAACAATTTACCCCAA
340 350 360
TTACTTTTAGAATATCCAAGTACATTAAGG
AATGAAAAATCTTATAGGTTCATGTAATTCC
370 380 390
ACCAAAAGATTTTCCGTTTTAGCGATTAAA
TGGTTTTCTAAAAGGCAAAATCGCTAATTT
400 410 420

Abb.14


AAGAAACTATGAAAAAAGTTATATAGAATC
TTCTTTGATACTTTTTTCAATATATCTTAG
430 440 450
ACTATATATCTATTACTAAAATTCTTTTTT
TGATATATAGATAATGATTTTAAGAAAAAA
460 470 480
ATAAATTAACAAATATCTGATAATCGGTCC
TATTTAATTGTTTATAGACTATTAGCCAGG
490 500 510
TAAAATTATAGTTCCTATGGTCTATACAAT
ATTTTAATATCAAGGATACCAGATATGTTA
520 530 540
TAATAGATTTATAGGGGCATATAGAAGAAT
ATTATCTAAATATCCCCGTATATCTTCTTA
550 560 570
AATAAAGTCTAGAAAGTTTAATTCTAGATA
TTATTTCAGATCTTTCAAATTAACAACTAT
580 590 600
TCTAATAATATAGGAAGATAAATAGTTATA
AGATTATTATATCCTTCTATTTATCAATAT
610 620 630
AAGAATATTATCACTTCCGTGTAATGATAA
TTCTTATAATAGTGAAGGCACATTACTATT
640 650 660
TGATATTTGATTCCCTATCAATATATGAAG
ACTATAAACTAAGGGATAGTATATACTTC
670 680 690
ATAGTAGGGCTCGAACCTACGACGTCGATA
TATCATCCCGAGCTTGGATGCTGCAGCTAT
700 710 720
TTAAAAGTATCGCACTCTAACCAACTGAGT
AATTTTCATAGCGTGAGATTGGTTGACTCA
730 740 750
TATACCTTCTTTATATAGGTTACTTAGGGT
ATATGGAAGAAATATATCCAATGAATCCCA
760 770 780
CTTTCCGCTATTGGCGAGGTGTAGGCGATT
GAAAGGCGATAACCGCTCCACATCCGCTAA
790 800 810
GCTAATTGTCTGGAATATTAAAAACTTCCT
CGATTAACAGACCTTATAATTTTTGAAGGA
820 830 840

```
TAGGAGTTCGAATCTCCTTTTGTCCGCAGT
ATCCTCAAGC.TTAGAGGAAA.ACAGGCGTCA.
          850          860        870

GATTATATTATATACCTATATATAGGTATA
CTAATATAAT.ATATGGATAT.ATATCCATAT.
          880          890        900

CCAAAATTAATGAATATAGAATATTTTTTT
GGTTTTAATT.ACTTATATCT.TATAAAAAAA.
          910          920        930
                                    H
TTTCGCTCTCTTTATTTgacctgcagccaagctt
AAAGCGAGAG.AAATAAA  .           .
          940          950        960
```

Abb. 14: Basensequenz des 963 bp EcoRI - HindIII ARS-Fragmentes aus pURY32#2-1.

(E) EcoRI Erkennungssequenz, (H) HindIII Erkennungssequenz.

Vektorsequenzen sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Die Basensequenz des EcoRI - HindIII Fragmentes wurde durch Sequenzierung der SspI Subfragmente nach Klonierung in den Zwischenvektor M13mp9 (HincII) ermittelt. Sequenzen, die die SspI Schnittstellen überlappen, wurden durch Sequenzierung des ARS-Fragmentes aus pURY32#2-1 nach Klonierung in den Zwischenvektor M13mp9 (HincII) und Umklonierung in M13mp8 (EcoRI - HindIII) ermittelt. Für das SspI Fragment B (s.u.) wurde nur die Basensequenz des unteren Stranges bestimmt. Für das SspI Fragment A (s.u.) wurde die Basensequenz von Position 281-400 und von Position 550 - 610 in nur einem Strang ermittelt.

Die Anordnung der SspI Fragmente des ARS-Fragmentes aus pURY32#2-1 ist: E(1-47), D(48-133), C(134-271), A(272-628) B(629-826), C1(827- 963) ,Fragmentbezeichnungen wie in Abb.11.

```
      E                                  ccgtcATTAAAAACTTC
cttaagggccc.ctaggcagTA.ATTTTTGAAG.
          10                  20                  30

CTTAGGAGTTCGAATCTCCTTTTGTCCGCA
GAATCCTCAA.GCTTAGAGGA.A\ACAGGCGT.
          40                  50                  60

GTGATTATATTATATACCTATATATATAGG
CACTAATATA.ATATATGGAT.ATATATCCAT.
          70                  80                  90

TACCAAAATTAATGAATATAGAATACTTTT
ATGGTTTTAA.TTACTTATAT.CTTATGAAAA.
         100                 110                 120

                                        H
TTTTTTCACTCTCTTTATTTgacctgcagc
AAAAAAAGTGA.GAGAAATAAA.ctggacgtcg.
         130                 140                 150

         * * * * * * * * * *
caagctATTTCTCTTTTGTGATAGTGTGTC
gttcgaTAAA.GAGAAAACAC.TATCACACAG.
         160                 170                 180

ACTTGTCGTATAAAAACCATCTCAAATTAC
TGAACAGCAT.ATTTTTTGGTA.GAGTTTAATG.
         190                 200                 210

ATTTAGTTACAAAGATAGTACATCCATATA
TAAATCAATG.TTTCTATCAT.GTAGGTATAT.
         220                 230                 240

      E
ATaattcccggggatccgtcAAAGTAAACA
TAttaagggc.ccctaggcag.TTTCATTTGT.
         250                 260                 270

GGTAAACAATTTTTAGAATgacctgcagcc.
CCATTTGTTA.AAAATCTTA .      .
         280                 290                 300

   H
aagcttggg
```

Abb. 15: Basensequenz des 305 bp EcoRI - HindIII ARS-Fragmentes aus pURY32#2-1/1.

EcoRI Erkennungssequenz (E), HindIII Erkennungssequenz (H).
Aufgefüllte HindIII Schnittstelle [H],
Aufgefüllte EcoRI Schnittstelle [E].
Sequenzen, die Homologie zur ARS Konsensussequenz (Broach et al., 1983) besitzen, sind mit *** gekennzeichnet.
Vektorsequenzen sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.
Die Basensequenz beider DNA-Stränge des 305 bp EcoRI - HindIII ARS-Fragmentes wurde durch Sequenzierung des Fragmentes in dem Zwischenvektor M13mp9 (HincII) und nach Umklonierung in M13mp8 (EcoRI + HindIII) ermittelt.

```
                                        g t c A T T A T A T G G A T G
c t t a a g g g c c c.c t a g g c a g T A.A T A T A C C T A C.
    E                10                  20                  30

T A C T A T C T T T G T A A C T A A A T G T A A T T T G A G
A T G A T A G A A A.C A T T G A T T T A.C A T T A A A C T C.
                 40                  50                  60

A T G G T T T T T A T C G A C A A G T A C A C A C T A T C A
T A C C A A A A A T.A G C T G T T C A T.G T G T G A T A G T.
                 70                  80                  90

  * * * * * * * * * * S
C A A A A G A G A A A T A T T C A T T T A A T A C A G A T A
G T T T T C T C T T.T A T A A G T A A A.T T A T G T C T A T.
                100                 110                 120

A T T T T C T A T C A C T T A T A C G A T C T A A A G A G T
T A A A A G A T A G.T G A A T A T G C T.A G A T T T C T C A.
                130                 140                 150

T T T T T A A G T A T T C T C G A T T T T A A G A T C T A T
A A A A A T T C A T.A A G A G C T A A A.A T T C T A G A T A.
                160                 170                 180

T A C T A A G T T T T C T T T A G T A T T T A T T A A A A G
A T G A T T G A A A.A G A A A T C A T A.A A T A A T T T T C.
                190                 200                 210

G A A T A T A A A C C G T A A T T A A T A T A G A A G A A T
C T T A T A T T T G.G C A T T A A T T A.T A T C T T C T T A.
                220                 230                 240

                    H
g a c c t g c a g c.c a a g c t t
c t g
```

Abb. 16: Basensequenz des 256 bp EcoRI - HindIII ARS-Fragmentes aus pURY32#2-1/2

(E) EcoRI Erkennungssequenz, (H) HindIII Erkennungssequenz, (S) SspI Erkennungssequenz.

Sequenzen, die Homologien zur ARS Konsensussequenz (Broach et al., 1983) aufweisen, sind mit *** gekennzeichnet. zeichnet. Vektorsequenzen sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Die Basensequenz beider DNA-Stränge wurde durch Sequenzierung des Fragmentes in dem Zwischenvektor M13mp9 (HincII) und nach Umklonierung in M13mp8 (EcoRI - HindII) ermittelt.

3.2.2 Versuche zur Transformation von *U.maydis*

Um die Replikationsorigin-Funktion der mitochondrialen *U.maydis* ARS-Fragmente in *U.maydis* zu testen, muß der Vektor eine in *U.maydis* selektionierbare Eigenschaft besitzen. Außerdem muß gewährleistet sein, daß DNA von *U.maydis* aufgenommen wird und die selektionierbare Eigenschaft exprimiert wird.

Zellen sind natürlicherweise nicht kompetent für DNA Aufnahme. Die Permeabilitätsbarriere (Zellwand, Zellmembran) muß entweder entfernt oder modifiziert werden.

Die Transformation von Pilzen wird gewöhnlich mit Modifikationen der für Hefe entwickelten Methoden durchgeführt (z.B. Transformation von *Neurospora* : Case et al., 1979, Dhawale et al., 1984; Transformation von *Aspergillus* : Ballance et al., 1983; Tilburn et al., 1983; Transformation von *Podospora* : Tudzynski et al., 1980).

Die eine Methode (Hinnen et al., 1978; Beggs, 1978) schließt den enzymatischen Zellwandabbau ein. Die Spheroplasten werden in einem osmotisch stabilisierenden Puffer mit Kalziumionen inkubiert und DNA hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen durch Polyäthylenglykol aggregiert und präzipitiert. Die Spheroplasten werden in geeigneten selektiven Medien regeneriert.

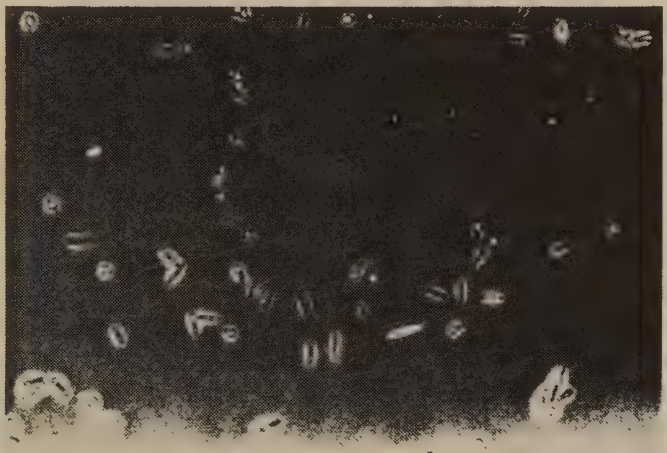
Eine andere Methode basiert auf der Inkubation von intakten Hefezellen mit alkalischen Kationen wie Li^+, Ca^+, Rb^+ und Na^+ (Ito et al., 1983). Auch bei dieser Methode ist die Behandlung der Zellen, zur Stimulierung der DNA Aufnahme, mit Polyäthylenglykol erforderlich. Letztere Transformationsprozedur ist weniger zeitaufwendig. Die Transformationseffizienz mit Plasmiden, die den 2-micron Replikationsorigin besitzen, ist jedoch 500 - 10.000 mal schlechter als die mit spheroplastierten Hefezellen erreichte (Ito et al., 1983). Voraussetzung für die Anwendung dieser Techniken sind geeignete Selektionsverfahren, um Zellen, die rekombinante DNA aufgenommen haben, zu identifizieren. Als selektionierbare Eigenschaften in einem Wirts-Vektor System können Resistenzen gegen Antibiotika und Fungizide oder die Komplementation auxotropher Mutationen verwendet werden.

3.2.2.1 Spheroplastierung und Regeneration von *U.maydis*

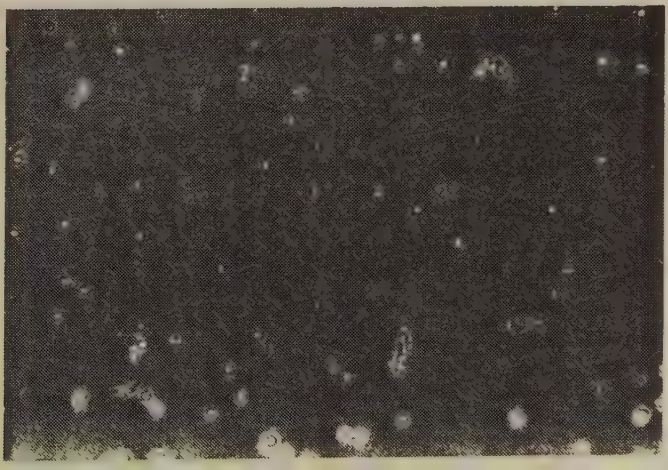
Verschiedene zellwandabbauende Enzyme oder Enzymgemische wie β-Glucuronidase, Zymolyase, Cellulase "Onozuka R-10", Novozym 234 wurden einzeln oder in Kombination in verschiedenen Konzentrationen in ihrer Fähigkeit, die Zellwand von *U.maydis* Sporidien abzubauen und regenerationsfähige Spheroplasten zu erzeugen, untersucht. Hierzu wurden *U.maydis* Zellen (frühe logarithmische Phase) in einem osmotisch stabilisierenden Puffer (Hefe-Spheroplastierungspuffer (2.7), 1.2 M Sorbitol) mit den Enzymen oder Enzymgemischen (s.o.) bei 30°C inkubiert. Die Spheroplastierung wurde im Lichtmikroskop kontrolliert (Abb. 17). Waren 70 - 80 % der Zellen protoplastiert (Abb. 17C), wurden die zellwandabbauenden Enzyme entfernt (3 mal waschen mit 1.2 M Sorbitol, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl; vor dem letzten Waschvorgang wurde ein Aliquot entnommen und zur Kontrolle des Spheroplastierungsgrads auf VM Platten ausgestrichen). Die Spheroplasten wurden für 1.5 Stunden vorregeneriert (3 ml 1.2 M Sorbitol, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl + 1.5 ml NSY, 1.2 M Sorbitol) und abschließend in VM-Regenerationsagar (2.3.1) eingebettet. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C bis Kolonien deutlich sichtbar waren. In VM-Regenerationsagar eingebettete *U.maydis* Zellen erreichten nach 5 bis 7 Tagen Inkubation eine Koloniegröße von 1 mm Durchmesser.

Alle getesteten Kombinationen zellwandabbauender Enzyme (β-Glucuronidase/Cellulase "Onozuka R-10", Zymolyase/β-Glucuronidase/Cellulase "Onozuka R-10", β-Glucuronidase/Zymolyase, Novozym 234/Cellulase "Onozuka R-10") erlaubten die Spheroplastierung von *U.maydis* Sporidien. Die Regenerationsfähigkeit der Spheroplasten, die durch Behandlung mit Novozym 234 (25 mg/ 1×10^8 Sporidien / 5 ml) und Cellulase "Onozuka R-10" (90 units / 1×10^8 Sporidien / 5 ml) erhalten wurden, lag deutlich höher als bei den anderen Enzymkombinationen. Die Regenerationsraten betrugen, unabhängig vom verwendeten *U.maydis* Stamm, 4 % bis 8 % bei einem Spheroplastierungsgrad > 90 %. Diese Werte liegen höher als die in vergleichbaren Experimenten erreichte Regeneration von z.B. Podospora anserina (1 - 3 %, Tudzynski und Esser, 1979) und höher als die in unserem Labor erreichte Regeneration von Hefespheroplasten (1-5 %).

A



B



C

Abb. 17: Spheroplastierung von *U.maydis* 32 Sporidien durch Novozym 234/Cellulase "Onozuka R-10".

Die Sporidien wurden, wie beschrieben, mit dem Enzymgemisch inkubiert. Aliquots wurden nach 20 Min. und 40 Min. entnommen.

A - Sporidien in 1.2 M Sorbitol vor Enzymzugabe Vergrößerung: x 200
B - Sporidien nach 20 Min. Inkubation mit dem Enzymgemisch. Vergrößerung: x 200
C - Sporidien nach 40 Min. Inkubation mit dem Enzymgemisch. Vergrößerung: x 200

3.2.2.2 Versuche zur Transformation von *U.maydis* durch Komplementation auxotropher Mutanten

Isolierung auxotropher *U.maydis* Mutanten nach UV-Bestrahlung

Die Induktion von Mutationen in *U.maydis* erfolgte nach Holliday (1961b). Alle Mutationen wurden in *U.maydis* 32 erzeugt.

Die UV-Bestrahlung von *U.maydis* 32 (frühe logarithmische Phase) erfolgte für 1.25 Min. in sterilem H_2O mit UV Licht (254 nm, Abstand 10 cm). Die Überlebensrate betrug 0.34 %. 10 800 Kolonien wurden von VM-Platten auf MM-Platten replica plattiert. (Lederberg und Lederberg, 1951). Als potentielle Mutanten wurden Kolonien isoliert, die Wachstum auf VM-Platten, aber nicht auf MM-Platten zeigten. Zur Stabilitätskontrolle wurden 70 potentielle Mutanten vierzigmal über VM-Platten passagiert, anschließend in NSY kultiviert und dann auf MM-Platten ausgestrichen (1×10^8 Sporidien). 14 der ursprünglich 70 Mutanten zeigten weiterhin kein Wachstum auf MM-Platten (Reversionsrate $< 1 \times 10^{-8}$).

Die Bestimmung der von den Mutanten benötigten Wachstumsfaktoren erfolgte nach Ausstreichen (von frischen VM-Plattenkulturen) auf MM-Platten mit verschiedenen Zusätzen (Tab. 4).

Tab. 4 MM-Plattenschema zur Charakterisierung der Auxotrophien von *U.maydis* 32 Mutanten

	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5
# 6	Adenin	Guanin	Cystein	Methionin	Uracil
# 7	Histidin	Leucin	Isoleucin	Valin	Lysin
# 8	Phenylalanin	Tyrosin	Tryptophan	Threonin	Prolin
# 9	Glutaminsäure	Serin	Alanin	Asparaginsäure	Arginin
# 10	Nikotinsäure	Thiamin	Cholin	Pyridoxin	Inositol
# 11	Folsäure	Amino-benzoesäure	Kalzium-panthotenat	Riboflavin	Hypo-xanthin

Die Endkonzentrationen der MM-Platten-Zusätze sind in 2.3.1 beschrieben. Die Zusätze für MM-Platten #1-#5 sind von oben nach unten und die Zusätze für MM-Platten #6-#11 von links nach rechts zu lesen. Je 2 MM-Platten besitzen eine gemeinsame Komponente. Wächst eine *U.maydis* 32 Mutante z.B. auf #2 und #9, so braucht sie die Aminosäure Serin zum Wachstum.

Von den 14 *U.maydis* 32 Mutanten benötigten 7 exogen zugeführtes Adenin-Hypoxanthin, 4 Arginin, 1 Methionin, 1 Leucin und 1 Kalziumpanthotenat zum Wachstum auf MM-Platten. Die Frequenz stabiler auxotropher Mutanten lag bei 0.13 %. Dieses entspricht publizierten Daten (Holliday, 1961b). Der Verteilung der Auxotrophien für Aminosäuren (43 %), Pyrimidine/Purine (50 %) und andere Metaboliten (7 %) weicht von den publizierten Werten für Aminosäuren (34 %), für Pyrimidine/Purine (23 %) und andere Metaboliten (35 %) (Holliday, 1961b) im Bereich statistischer Schwankungen ab.

Alle *U.maydis* 32 Mutanten wurden im Platemating Plattentest (2.11.4) und im Pflanzentest (2.11.5) in ihrer Kompatibilität mit *U.maydis* 126 und auf Pathogenität (allein und in Kombination mit *U.maydis* 126) überprüft. Alle Mutanten waren kompatibel mit *U.maydis* 126 und zeigten die typische Pathogenitätsreaktion (6 - 8 von 10 Pflanzen bildeten Gallen).

Versuch der Transformation von auxotrophen *U.maydis* Mutanten durch Komplementation

Nachdem die Spheroplastierung und Regeneration von *U.maydis* standardisiert war und sich die UV induzierten *U.maydis* 32 Mutanten stabil verhielten (Reversionsrate < 1×10^{-8}) wurde versucht, Mutanten durch Transformation mit rekombinanter DNA zu komplementieren. In Vorversuchen wurden *U.maydis* 32 Mutanten mit in YRp7 und Yep24 "shotgun" klonierter chromosomaler *U.maydis* 126 DNA inkubiert (s.u.). Wenn DNA von spheroplastierten *U.maydis* Zellen aufgenommen wird und unter den angebotenen Ligationsprodukten zur Komplementation geeignete DNA vorhanden ist, sollten einige prototrophe Transformanden auftreten. Sie können durch Integration des Ligationsproduktes über homologe Rekombination in das *U.maydis* Genom entstanden sein. Oder falls der 2 micron-Replikationsorigin (Yep24) oder das ARS1 Element aus Hefe (YRp7) in *U.maydis* zur Replikation des Plasmids genutzt werden, können die Plasmide auch frei in der Zelle vorliegen.

Die *U.maydis* 32 Leu^- Mutante wurde nach dem Hefetransformationsprotokoll (2.11.7) mit DNA inkubiert und wie dort beschrieben weiterbehandelt. Die in diesen Versuchen verwendeten DNAs waren Ligationsansätze von in YRp7 (BamHI linearisiert) und Yep24 (BamHI linearisiert) "shotgun" klonierter chromosomaler *U.maydis* 126 DNA (BamHI oder BglII geschnitten). Jeder Ligationsansatz,der verwendet wurde, enthielt 3 µg DNA. Als Negativkontrollen wurden 2 µg YRp7, 2 µg Yep24 und 20 µg Kalbsthymus DNA eingesetzt. Die Zellen wurden nach Vorregeneration (1.5 Stunden in 3 ml 1.2 M Sorbitol, 10 mM $NaCl_2$, 10 mM Tris-HCl,pH 7.5 und 1.5 ml 1.2 M Sorbitol/NSY) in MM-Regenerationsagar eingebettet und bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen Inkubation waren auf allen Platten kleine Kolonien zu sehen. Nach sechs Tagen waren diese zu unterschiedlich großen Kolonien ausgewachsen. Das Auftreten von großen und kleinen Kolonien war nicht auf die mit den Ligationsansätzen inkubierten Zellen beschränkt. Es wurden je 5 Kolonien jedes Transformationsversuchs auf MM-Platten ausgestrichen. Alle Kolonien wuchsen auf MM-Platten.

Offensichtlich wurde bei Anwendung der Hefetransformationsprozedur die Reversionsrate für die *U.maydis* 32 (Leu^-) Mutante von $< 1 \times 10^{-8}$ um das 1000 - 10 000 fache ($> 1 \times 10^{-5}$) erhöht. Die Transformation wurde mit anderen *U.maydis* 32 Mutanten (Met^-, Ade^-, Arg^-), wie für die Leu^- Mutante beschrieben, durchgeführt. Es wurden ähnlich hohe Reversionsraten ($> 1 \times 10^{-5}$) erhalten.

3.2.2.3 Versuche zur Transformation von *U.maydis* mit prokaryotischen Resistenzgenen

Als Alternative zur Komplementation von auxotrophen Mutanten bietet sich die Klonierung von Resistenzgenen an, deren Genprodukte Antibiotika oder Fungizide inaktivieren. Die Selektion kann mit Wildtypstämmen, die sensitiv auf entsprechende Antibiotika oder Fungizide reagieren, durchgeführt werden. Einige der sehr gut charakterisierten prokaryotischen Resistenzgene vermitteln auch in Eukaryoten Resistenz gegen z.B. Kanamycin, Neomycin, G418. Kanamycin, Neomycin und G418 sind aminoglykosidische Antibiotika. Neomycin und Kanamycin lagern sich an die kleine Untereinheit der 70S-Ribosomen an und verhindern das korrekte Ablesen des Transkripts. G418 lagert sich an die 80S-Ribosomen an und blockiert dadurch die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen.

Diese aminoglykosidischen Antibiotika können durch die bakteriellen Aminoglykosid-Phosphotransferasen I und II (APH(3')I und APH(3')II) inaktiviert werden (Davies und Smith, 1978; Jimenez und Davies, 1980). APH(3')I und APH(3')II werden durch auf den Transposons Tn601 (Tn903) und Tn5 liegenden Gene kodiert.

Das APH(3')I Gen kann z.B. in *Saccharomyces* und *Kluyveromyces lactis* exprimiert werden. Es vermittelt in *S.cerevisiae* Neomycinresistenz (Hollenberg, 1979) und Resistenz gegen G418 (Jimenez und Davies, 1980). In *K.lactis* wurde Resistenz gegen G418 nachgewiesen (Sreekrischna et al., 1984).

Das APH(3')II Gen wird in Säugerzellen nur exprimiert, wenn es unter Kontrolle eines eukaryotischen Promoters, z.B. des frühen SV40 Promoters ist (Southern und Berg, 1982). In *Dictyostelium*

wurde Expression des APH(3')II Gens nach Fusion an den Aktin 8-Gen Promotor (*Dictyostelium*) erreicht (Hirth et al., 1980). In Pflanzen wurde Resistenz gegen G418 und Kanamycin nachgewiesen, wenn das APH(3')II Gen vom Nopalin-Synthetase Promotor (Ti-Plasmid) kontrolliert wird (Bevan und Flavell, 1983; Herrera-Estrella, 1983).

Der Versuch *U.maydis* mit klonierten prokaryotischen Resistenzgenen zu transformieren, wurde nach Ermittlung der Konzentrationen von Neomycin und G418, die eine vollständige Wachstumshemmung bewirken, und nach Konstruktion verschiedener pURY Plasmid Derivate durchgeführt.

Ermittlung der optimalen Hemmkonzentration von Neomycin und G418 für *U.maydis*

Für *U.maydis* 32 und 126 wurde diejenige Konzentration Neomycin und G418 bestimmt, die das Wachstum auf festen Nährmedien vollständig inhibiert. Hierzu wurden frische Sporidienkulturen verdünnt und auf VM-Platten mit unterschiedlichen Neomycin-, G418-Konzentrationen ausgestrichen.

Die ermittelten optimalen Hemmkonzentrationen waren für *U.maydis* 126 6 mg/ml Neomycin, 1 mg/ml G418 und für *U.maydis* 32 10 mg/ml Neomycin, 2 mg/ml G418.

Bei suboptimalen Hemmkonzentrationen von Neomycin wurden Kolonien mit stark veränderter Morphologie (unregelmäßige, aufgeworfene Kolonieformen, farblich von gelblich bis schwarz variierend) gebildet. Bei suboptimalen Hemmkonzentrationen von G418 traten keine morphologisch veränderten Kolonien auf. Aus diesem Grund wurde die Selektion von Transformanden mit G418 durchgeführt.

Konstruktion von pURY-neo Derivation

Es wurden Vektoren konstruiert, die das APH(3')I- oder das APH(3')II Gen enthielten. pURY32#2-1/2-neo1, -neo2 und pURY32#3A3-neo1, -neo2 wurden wie im Folgenden beschrieben, konstruiert:

Das APH(3')II Gen und flankierende Regionen wurden aus pSV2neo (Southern und Berg, 1982) isoliert (Abb. 18A). pSV2neo enthält pBR322 Sequenzen (den pBR322 Replikationsorigin und das β-Laktamasegen), das APH(3')II Gen von Tn5 und SV40 Anteile (Abb. 18A).

In diesem Vektor liegt der frühe SV40 Promotor in Transkriptionsrichtung vor dem APH(3')II Gen. Am 3'-Ende des APH(3')II Gens befindet sich das Polyadenylierungssignal der frühen SV40 Gene. pSV2neo wird für Säugerzellentransformation benutzt. Die Selektion erfolgt mit G418 (Southern und Berg,1982). Der APH(3')II geneigene Promotor wird in Säugerzellen nicht genutzt. Die Transkription des APH(3')II Gens erfolgt am frühen SV40 Promotor.

Aus pSV2neo wurde nach AccI und EcoRI Spaltung das 3.4 kb Fragment, welches den frühen SV40 Promotor, das APH(3')II Gen und das Polyadenylierungssignal der frühen SV40 Gene enthält, isoliert (Abb. 18A). Die Fragmentenden wurden aufgefüllt (2.10) und die Fragmente in pURY32#2-1/2 und pURY32#3A3 (nach Linearisierung durch SalI und Auffüllen der Fragmentenden) kloniert.

Transformationskompetente DH5 Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert. Die Selektion erfolgte mit Ap und Km (60 µg/ml, 75 µg/ml). Aus DH5 Transformanden wurde Plasmid DNA isoliert (2.9.4.2) und die Orientierung des APH(3')II Gens durch Spaltung der Plasmide mit BamHI bestimmt. Es wurden beide Orientierungen des APH(3')II Gens erhalten (Abb. 18A).

Die pURY-neo Plasmid Derivate wurden zunächst in Hefezellen auf Expression des APH(3')II Gens getestet. Nach Transformation von Y220 (2.11.7) wurde auf URA^+ Zellen selektioniert. Die pURY-neo Plasmid Derivate zeigen die für pURY32#2-1/2 und pURY32#3A3 charakteristischen Transformationseffizienzen (1×10^3 - 5×10^3 URA^+ Zellen/µg Plasmid). Je 3 URA^+ Kolonien wurden auf YNB-Platten (minus Uracil) ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Mehrere Kolonien wurden anschließend in sterilem H_2O resuspendiert und auf YPD-G418-Platten (1 mg/ml und 1.5 mg/ml G418) ausgestrichen. Zur Kontrolle wurde der Hefestamm Y220 (Anzucht auf YNB (plus Uracil) ebenso auf YPD-G418-Platten (1 mg/ml und 1.5 mg/ml G418) ausgestrichen. Kein Y220/pURY-neo1, -neo2

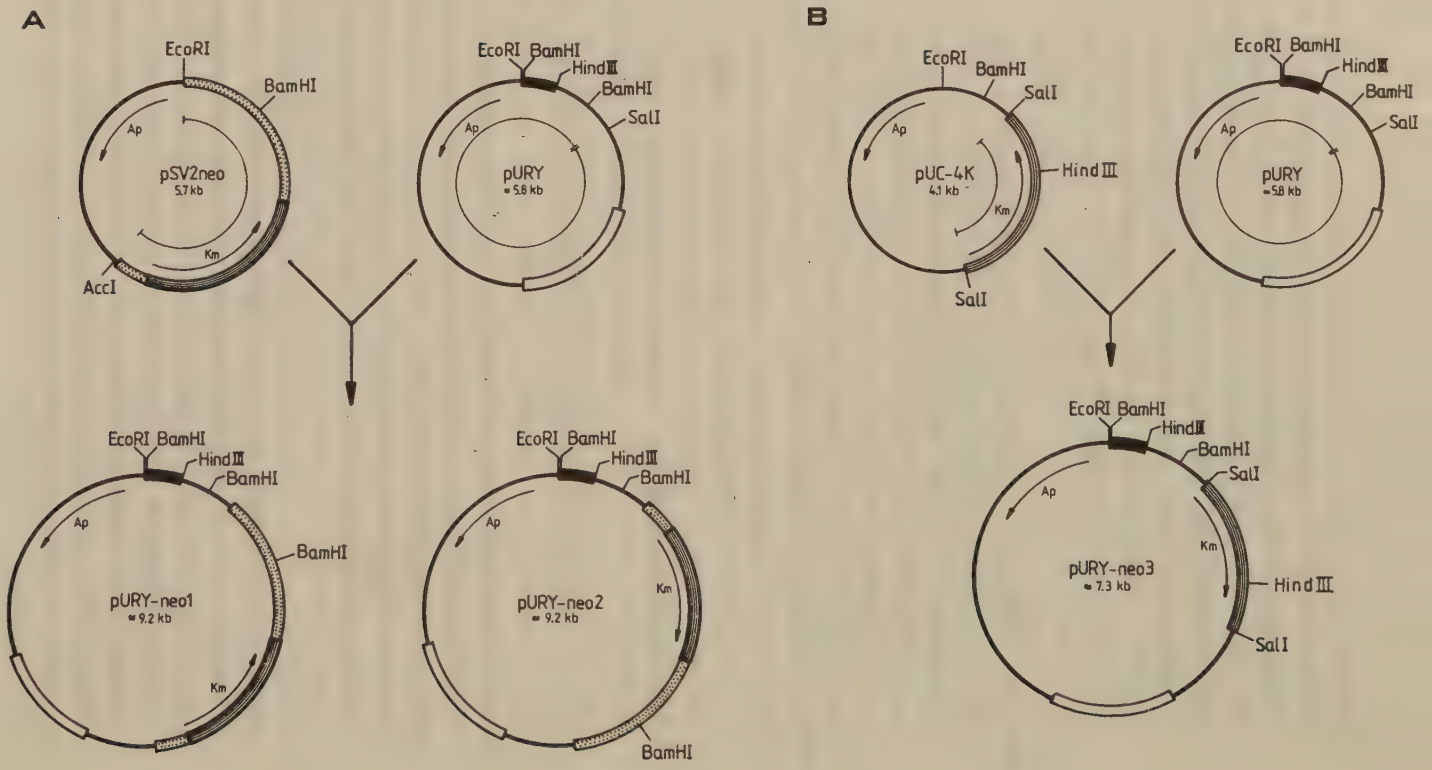
Stamm wuchs auf YPD-G418-Platten (1 mg/ml oder 1.5 mg/ml). Das APH(3')II Gen scheint in Hefe entweder gar nicht oder in dem konstruierten Plasmid nicht exprimiert werden zu können.

Die Plasmide pURY32#2-1/2-neo3 und pURY32#3A3-neo3 wurden durch Insertion des APH(3')I Gens in pURY32#2-1/2 und pURY32#3A3 konstruiert (Abb. 18B). Das APH(3')I Gen wurde aus dem Vektor pUC4K (Vieira und Messing, 1982) nach Spaltung mit SalI isoliert (Abb. 18B). Das entsprechende Fragment wurde in durch SalI linearisierte pURY32#2-1/2 und pURY32#3A3 DNA kloniert. DH5 Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert. Die Selektion erfolgte auf Ap/Km Platten (60 µg/ml, 75 µg/ml). Aus Transformanden wurde Plasmid DNA isoliert (2.9.4.2) und die Orientierung des APH(3')I Gens nach Spaltung der Plasmide mit PstI + HindIII ermittelt. Es wurde nur eine Fragmentorientierung erhalten (Abb. 18B). Y220 wurde mit pURY-neo3 Plasmiden transformiert (2.11.7). Es wurde zunächst auf den URA^+ Phänotypen selektioniert. Die mit pURY-neo3 erhaltenen Transformationseffizienzen entsprechen denen der Ausgangsplasmide (1×10^3 - 5×10^3 URA^+ Zellen/µg Plasmid). Anschließend wurde die Expression der G418 Resistenz wie für die Y220/pURY-neo1, -neo2 Stämme beschrieben, getestet. Alle Y220/pURY-neo3 Stämme wuchsen auf YPD-Platten bei G418 (1 mg/ml), während Y220 kein Wachstum auf YPD-Platten mit G418 (1 mg/ml) zeigte.

Versuch der Transformation von *U.maydis* 32 mit pURY-neo Plasmid Derivate

Mit den pURY-neo Plasmid Derivaten wurde die Transformation von *U.maydis* 32 zur Expression der G418 Resistenz versucht. Sollte eines der *U.maydis* ARS-Fragmente autonome Replikation in *U.maydis* ermöglichen und ein funktionsfähiges APH(3')I- oder APH(3')II-Genprodukt gebildet werden, sollten in diesen Versuch einige G418 resistente *U.maydis* Kolonien auftreten. *U.maydis* 32 wurde wie beschrieben spheroplastiert, mit je 3 µg Plasmid DNA inkubiert und wie in 2.11.7 beschrieben weiterbehandelt.

Die verwendeten Plasmid-DNAs waren pSV2neo, pMP78-1 (Kontroll DNA) und pURY32#2-1/2-neo1, -neo2, -neo3, pURY32#3A3-neo1, -neo2, -neo3


A
EcoRI
BamHI
Ap
pSV2neo
5.7 kb
Km
AccI
EcoRI BamHI
HindIII
BamHI
SalI
Ap
pURY
≈ 5.8 kb
EcoRI BamHI
HindIII
BamHI
Ap
pURY-neo1
≈ 9.2 kb
BamHI
Km
EcoRI BamHI
HindIII
BamHI
Ap
pURY-neo2
≈ 9.2 kb
Km
BamHI
B
EcoRI
BamHI
SalI
Ap
pUC-4K
4.1 kb
Km
HindIII
SalI
EcoRI BamHI
HindIII
BamHI
SalI
Ap
pURY
≈ 5.8 kb
EcoRI BamHI
HindIII
BamHI
SalI
Ap
Km
pURY-neo3
≈ 7.3 kb
HindIII
SalI

und pMP81. Die Selektion erfolgte durch Einbetten der Spheroplasten in VM-Regenerationsagar (2 mg/ml G418). Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Nach fünf Tagen waren auf allen Platten 300 - 2000 *U.maydis* 32 Kolonien (∿ 1 mm Durchmesser) gewachsen. Es konnte kein Wachstums- oder Zahlenunterschied zwischen den mit Kontroll DNA (pSV2neo, pMP78-1) und den mit pURY-neo Derivaten oder pMP81 inkubierten Zellen festgestellt werden.

Die Transformation von *U.maydis* 32 mit den pURY-neo Derivaten wurde nur einmal versucht. *U.maydis* Sporidien verhalten sich in vieler Hinsicht anders als *U.maydis* Spheroplasten. Die Vorbedingungen für Transformationsversuche mit spheroplastierten *U.maydis* Zellen müssen daher mit Spheroplasten getestet werden.

Abb.18: Konstruktionsschema der pURY-neo Derivate

▭ : URA3 Gen aus Hefe

▭ : SV40 früher Promotor und Polyadenylierungssignal

▬ : *U. maydis* ARS Fragmente

⊢⊣ : Fragmente, die ligiert wurden

A: Das APH (3')II Gen (▭) wurde mit den flankierenden SV40 (▭) Sequenzen aus pSV2neo nach Spaltung mit AccI und EcoRI isoliert und nach Auffüllen der Fragmentenden mit SalI linearisierter, an den Fragmentenden aufgefüllter pURY32 # 2-1/2 oder pURY32 # 3A3 DNA ligiert. Die Orientierung des APH (3')II Gens wurde nach Spaltung mit BamHI ermittelt.
(—) : pBR322 Sequenzen

B: Das APH (3')I Gen (▭) wurde nach Spaltung mit SalI aus pUC-4K isoliert und mit SalI linearisierter pURY32 # 2-1/2 oder pURY32 # 3A3 DNA ligiert. Die Orientierung des APH (3')I Gens wurde durch HindIII Spaltung bestimmt.
(—) : M13 mp7 Sequenzen (pUC-4K) b.z.w. pBR322 Sequenzen (pURY Plasmide)

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden *U.maydis* ARS-Fragmente isoliert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß alle ARS-Fragmente mitochondrialen Ursprungs sind. Mit den mitochondrialen ARS-Fragmenten wurde ein Restriktionspolymorphismus in mitochondrialer DNA der Ausgangsstämme 126 und 32 nachgewiesen. DNA Restriktionspolymorphismen sind ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Sie wurden zuerst an gut charakterisierbarer DNA, wie sie mitochondriale DNA darstellt, beobachtet. Restriktionspolymorphismus kann in Folge von Punktmutationen oder DNA Rearrangements entstehen. Es ist beispielsweise gezeigt worden, daß der Restriktionspolymorphismus in mitochondrialer DNA aus höheren Säugern primär durch Punktmutationen ausgelöst wird (Brown et al., 1979; Brown, 1980), während in pflanzlicher DNA vorwiegend DNA Umorganisationen die Ursache sind (z.B. *Zea mays*;Lonsdale, 1984; *Brassica campestris*; Palmer und Shields, 1984). Restriktionspolymorphismen sind zu einem wichtigen Instrument in der medizinischen Diagnostik geworden (Gill et al., 1985). Sie dienen zur Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb einer Art und zwischen Arten (Brown, 1980; Hintz et al., 1985; Garber und Yoder, 1984; Helentjaris et al., 1985). Der mit *U.maydis* ARS-Fragmenten nachgewiesene Restriktionspolymorphismus mitochondrialer DNA wurde von Schulz (1986) zur Typisierung von Nachkommen einer Kreuzung zwischen *U.maydis* 126 und 32 benutzt. Von ihm konnte damit die uniparentale Vererbung von *U.maydis* Mitochondrien nachgewiesen werden. Raeder und Broda (1986) nutzten den Restriktionspolymorphsmus von *Phanerochaete* DNA ebenfalls zur Charakterisierung von Kreuzungsnachkommen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß alle bisher aus *U.maydis* DNA isolierten ARS-Fragmente mitochondrialen Ursprungs sind. Darunter fallen auch die ursprünglich von Banks (1983a) isolierten "chromosomalen"ARS-Fragmente. Die Zordnung "chromosomal" erfolgte bei Banks ohne Hybridisierungskontrolle mit mitochondrialer DNA aus dem für die Isolierung von ARS-Fragmenten benutzten Stamm. Die von Banks (1983a) gezeigten Hybridisierungssignale der *U.maydis* ARS-Fragmente mit chromosomaler DNA beruhen mit Sicherheit auf geringfügiger Konta-

mination der chromosomalen DNA Fraktion mit mitochondrialer DNA. Solche, fälschlich von ihm als Indiz für chromosomalen Ursprung der ARS-Fragmente gewerteten Signale, treten nach Exposition für 48 - 72 Stunden an identischer Position zu den in mitochondrialer DNA nach Exposition für 3 - 12 Stunden bereits stark hybridisierenden Fragmenten auf (Abb. 10).

In unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden 6 verschiedene, ausschließlich mitochondriale *U.maydis* ARS-Fragmente isoliert (Banks, 1983a; vorliegende Arbeit). Die Größe des mitochondrialen Genoms von *U.maydis* beträgt etwa 75 Kb (Schulz, 1986), d.h. alle 12 Kb kommt eine ARS Sequenz vor. Für *S.cerevisiae* wurde eine ARS Sequenz pro 30 Kb ermittelt (Williamson, 1985). Da mehrere der *U.maydis* ARS-Fragmente wiederholt isoliert wurden, gehe ich davon aus, daß die Kollektion dieser 6 ARS-Fragmente repräsentativ für mitochondriale ARS-Sequenzen von *U.maydis* ist.

Die Isolierung von Plasmiden mit mitochondrialen ARS-Fragmenten erfolgte aus Hefeklonen, die unter selektiven Bedingungen gutes Wachstum zeigten. Aus vielen weniger gut wachsenden Hefetransformanden konnte keine Hefe Plasmid DNA für eine *E.coli* Transformation isoliert werden. Wie ist der selektive Wachstumsvorteil von Populationen mit Plasmiden, die mitochondriale *U.maydis* ARS-Fragmente besitzen, zu interpretieren? Murray und Szostak (1983) zeigten, daß Zellpopulationen, in denen Zellen mit hoher ARS Plasmidkopienzahl vorliegen, einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber Populationen besitzen, deren Zellen weniger Plasmidkopien enthalten. Sie wiesen nach, daß mitotische Instabilität von zirkulären ARS Plasmiden durch gerichtete Segregation in die Mutterzelle hervorgerufen wird. Sie postulieren, daß während der Replikation von zirkulären ARS Plasmiden eine Assoziation mit einem Zellkernkompartiment erfolgt, das für Segregation in die Mutterzelle determiniert ist. Die replizierten Plasmide liegen als Concatemere vor. Monomere werden durch eine Topoisomerase freigesetzt. Nur freigesetzte Monomere können

segregieren, während alle nicht aufgelösten Concatemere und replikativen Stadien in der Mutterzelle verbleiben. Je mehr Plasmidkopien in einer Zelle vorliegen, desto größer ist die Chance der Tochterzelle Plasmidmoleküle zu erhalten.

Plasmide mit mitochondrialen *U.maydis* ARS-Fragmenten scheinen in hoher Kopienzahl vorzuliegen. Unter selektiven Bedingungen besitzen 5% - 20% der Zellen in einer Population Plasmid DNA (gemessen an URA$^+$ Zellen). Enthalten instabilere Hefetransformanden (weniger als 2% URA$^+$ Zellen unter selektiven Bedingungen) möglicherweise Plasmide mit chromosomalen *U.maydis* ARS-Fragmenten? Diese Frage ist mit den bisher durchgeführten Experimenten nicht zu beantworten. Überraschend war, daß in allen Fällen, in denen Plasmid DNA aus Populationen mit weniger als 2% URA$^+$ Zellen (unter selektiven Bedingungen) isoliert werden konnte, nach Passage über *E.coli* große Deletionen nachgewiesen wurden.

Diese Deletionen können in Hefe oder aber bei der Transformation in *E.coli* entstanden sein. Die Tatsache, daß überhaupt *E.coli* Transformanden erhalten wurden (mit ähnlichen Frequenzen wie für ARS Plasmide) deutet darauf hin, daß ARS Funktion in Hefe noch vorhanden war. Möglicherweise ist jedoch schon in Hefe der URA 3 Selektionsmarker verlorengegangen. Ein ähnlicher Befund wurde von Burmester und Wöstemeyer (1986) erhalten. Nach Passage über Hefe und E.coli traten in einem Plasmid mit mitochondrialem *Absidia glauca* ARS-Fragment Rearrangements auf. Sie zeigten, daß das in Hefe selektionierbare Gen (hier URA 3) deletiert worden war, das mitochondriale ARS-Fragment blieb jedoch erhalten.

Eine Analyse der in sehr instabilen Hefepopulationen vorliegende Plasmide (gemessen an URA$^+$ Zellen unter selektiven Bedingungen), steht noch aus. Über Hybridisierungen von Gesamt DNA aus dem jeweiligen Hefestamm mit Ylp5 DNA ließe sich beispielsweise nachweisen, ob die Deletionen schon in Hefe aufgetreten sind. Falls das nicht der Fall ist, ließe sich über Hybridisierung mit mitochondrialer *U.maydis* DNA klären, ob isolierte Fragmente der mitochondrialen oder Kern DNA

Fraktion zuzuordnen sind. Falls es überhaupt Plasmide mit chromosomalen *U.maydis* ARS Sequenzen gibt, sind sie mit Sicherheit in den extrem instabilen Hefetransformanden zu suchen. Man könnte dies als Indiz dafür werten, daß chromosomale Replikationsorigin von *U.maydis* in Hefe nur partiell funktionsfähig sind, d.h. entweder nur sehr ineffiziente Replikation erlauben oder Bereiche nicht besitzen, die für mitotische Segregation mitverantwortlich sind. Wenn dies der Fall ist, könnten Plasmide mit chromosomalen ARS Sequenzen durch Insertion von Zentromerregionen (CEN) mitotisch stabilisiert werden. ARS, CEN Plasmide liegen unter selektiven Bedingungen in ein bis zwei Kopien in 90% der Zelle einer Population vor (Clark and Carbon, 1980; Stinchcomb et al., 1982; Bloom et al.,1982). Denkbar wäre auch die Konstruktion von linearen ARS Plasmiden über Fusion mit Telomerregionen (Szostak und Blackburn, 1982). Solche linearen Plasmide liegen in Hefe beispielsweise in hoher Kopienzahl vor und sind mitotisch stabil (Murray und Szostak, 1983).

Gründe für die Schwierigkeit, chromosomale *U.maydis* ARS-Fragmente zu isolieren sind unklar, chromosomale ARS-Fragmente konnten aus einer Reihe von Organismen problemlos isoliert werden. Lediglich bei *Absidia glauca* ist der Versuch, chromosomale ARS-Fragmente zu isolieren, mit negativem Ergebnis verlaufen (Burmester und Wöstemeyer, 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurde die ARS Aktivität von drei mitochondrialen *U.maydis* ARS-Fragmenten auf kürzere Bereiche eingegrenzt. Die kürzesten ARS-Fragmente wurden sequenziert. In keinem der sequenzierten Fragmente wurde eine mit der ARS Konsensussequenz (Broach et al, 1983) übereinstimmende Sequenz gefunden. Es gibt jedoch Sequenzen, die Ähnlichkeiten zur ARS Konsensussequenz aufweisen (Abb. 19). In Abb. 19 sind diese Sequenzen im Vergleich mit einigen potentiellen ARS Sequenzen aus anderen Organismen und der ARS Konsensussequenz

(Broach et al., 1983) dargestellt.

Organismus	Bezeichnung des ARS- Fragments	Sequenz
Chlamydomonas reinhardii (Vallet et al.,1984)	O1	T T T T A c G T T T T
	O3	T T T T A T t T T T A
	O3	T T T T A T t T T T T
	O4	A T T T A T A T T T g
Chlorella ellipsoidea (Yamada et al.,1986)		A T T a A g G T T T T
		T T T A c G T T T T
		T T T A T A a T T A
Nicotiana tabacum (Ohtani et al.,1985)		T T T T A T A a T T A
Ustilago maydis (diese Arbeit)	32#2-1/1	T T T T c T c T T T A
	32#2-1/2	T T T T c T c T T T A
	32#3A3	T T T A g G T T T c
" ARS - Konsensus" (Broach et al.,1983)		$\frac{A}{T}$ T T T A T $\frac{A}{G}$ T T T $\frac{A}{T}$

Abb. 19: Vergleich der ARS- Konsensussequenz mit verschiedenen potentiellen ARS - Konsensussequenzen.
Von der Konsensussequenz abweichende Basen sind mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Durch Deletion oder Austausch einzelner Basenpaare in der ARS Konsensusregion von ARS 1 und ARS im Hefe HO Gen wurde die Relevanz einzelner stark konservierter Basenpaare in der ARS Konsensussequenz dieser ARS Elemente bewiesen (Celniker et al.,1984; Kearsey, 1984). Diese für ARS 1 und ARS im Hefe HO Gen bestimmten funktionellen Basenpaare innerhalb der ARS Konsensussequenz liegen jedoch nicht in allen ARS-Fragmenten konserviert vor. Mutationsanalysen zur Eingrenzung funktioneller Basenpaare in den abweichenden ARS Sequenzen sind bislang noch nicht durchgeführt worden. Der in Abb. 19 dargestellte Vergleich der potentiellen ARS Konsensussequenz zeigt, daß fast alle, die ARS Sequenzen von *U.maydis* eingeschlossen, von der ARS Konsensussequenz (Broach et al., 1983) abweichen. Denkbar wäre, daß in jeder ARS Konsensussequenz eine andere Basenpaarzusammensetzung toleriert wird. Möglicherweise spielen hierbei die jeweiligen flankierenden Sequenzen eine Rolle. Die flankierenden Sequenzen von ARS Konsensusregionen zeigen keine Sequenzhomologien, sind aber funktionell analog (Kearsey, 1984).

ARS Aktivität wird von Fragmenten unterschiedlicher Größe vermittelt. Das voll funktionsfähige ARS-Fragment aus dem Hefe HO Gen ist z.B. nur 48 bp groß, während volle ARS Aktivität des ARS 1 Fragments von einem mehrere hundert bp umfassenden Bereich vermittelt wird. Deletionsanalysen mit dem ARS-Fragment aus dem Hefe HO Gen und dem ARS 1 Fragment zeigten, daß direkt der ARS Konsensusregion benachbarte Sequenzen für Stimulierung von Transformationseffizien mitverantwortlich sind, während größere flankierende Bereiche für die mitotische Stabilität von ARS Plasmiden wichtig sind (Kearsey, 1984; Celniker et al.,1984, Stinchcomb et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß bei Verkürzung von drei *U.maydis* ARS-Fragmenten die mitotische Stabilität der Plasmide verringert wird (Abb. 11, pURY 126#1-1, pURY 32#2-1, pURY 32#3A3). Aus der Struktur der kleinsten ARS-Fragmente (pURY 32#2-1/1 und pURY 32#2-1/2) konnte der Bereich ermittelt werden, der für hohe Transformationseffizienz ver-

antwortlich ist. Die zwei kleinsten ARS-Fragmente (Abb. 15 und Abb. 16) sind aus mehreren, kurzen Ssp I Fragmenten zusammengesetzt. Sie enthalten beide ein Fragment auf dem die der ARS Konsensussequenz (Broach et al, 1983) ähnliche Sequenz lokalisiert ist. Dieses Fragment allein zeigt keine ARS Aktivität. In den zusammengesetzten ARS-Fragmenten ist dieses Fragment in dem einen Fall mit einem Fragment verknüpft, das ursprünglich links davon liegt und im anderen Fall ist das ursprünglich rechts liegende Fragment vorhanden. Die Orientierung der Fragmente zueinander ist jedoch anders als im Ausgangsfragment. Damit ist gezeigt, daß die Kontinuität bestimmter, die ARS Konsensusregion flankierender Sequenzen nicht gewahrt sein muß, ferner kann die Transformationseffizienz sowohl durch rechts als auch links von der Konsensusähnlichen Sequenz liegende Bereiche stimuliert werden. Für das ARS Element im Hefe HO Gen und das ARS 1 Element wurde die Bedeutung kurzer, die ARS Konsensusregion flankierender Sequenzen für Stimulierung einer hohen Transformationseffizienz nachgewiesen (Kearsey, 1984; Celniker et al., 1984). In diesen Fällen wurde jedoch nicht untersucht, ob Sequenzen auch in veränderter Orientierung zur ARS Konsensusregion ihre Funktion erfüllen können.

Auch wenn eine Reihe von Indizien für die Aussage sprechen, daß ARS und Replikationsorigin gleichzusetzen ist, ist ihre Identität bisher nicht bewiesen. ARS Sequenzen in Hefe treten in einer Häufigkeit auf, die mit dem Abstand von Replikationsorigins in Hefe vergleichbar ist (Beach et al., 1980; Chan und Tye, 1980). Die Initiation der DNA Replikation des 2-micron Plasmids in oder sehr nah an der ARS Sequenz wurde sowohl in vitro (Kojo et al.,1981; Celniker und Campell, 1982) als auch in vivo (Newlon et al.,1981) nachgewiesen. Demgegenüber stehen Beispiele bekannter Replikationsorigins von *Chlamydomonas reinhardii*

Chloroplasten DNA (Waddel et al., 1984) oder *Euglena gracilis* Chloroplasten DNA (Koller und Delius, 1982; Ravel-Chappuis et al.,1982) die keine ARS Aktivität besitzen (Vallet und Rochaix, 1985). Hingegen ist ARS Aktivität für andere Fragmente aus *Chlamydomonas reinhardii* Chloroplasten DNA nachweisbar (Loppes und Denis, 1983, Vallet et al.,1984). Es ist deshalb eine zu vereinfachende Vorstellung anzunehmen, mit ARS-Fragmenten Replikationsorigins isolieren zu können. Können autonome Replikation stimulierende Fragmente anderer Organismen durch Identifizierung in Hefe dazu benutzt werden,autonome Replikation im homologen Organismus zu gewährleisten? In einigen Fällen ist dieses nachgewiesen worden (Tudzynski und Esser, 1985; Rochaix et al., 1984.).

Das von Tudzynski und Esser (1982) isolierte mitochondriale Fragment aus *Cephalosporium acremonium* erlaubt autonome Replikation sowohl in *C.acremonium* als auch in *Podospora* (Tudzynski und Esser, 1985). Es ist unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen in Hefe mitotisch stabil. Erhöhte Stabilität unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen zeigte auch , das *U.maydis* ARS Plasmid pURY 32#3A. Falls erhöhte Plasmid-Stabilität in Hefe als Indiz für autonome Replikation im homologen System gewertet werden kann, wäre pURY 32#3A ein Erfolg versprechender Kandidat. Entsprechende Experimente stehen noch aus. In vielen anderen Fällen ließ sich jedoch keine autonome Replikation von ARS Plasmiden im homologen System nachweisen (z.B. Turner und Ballance, 1985; Roth et al., 1983; Rochaix et al., 1984).

Zusätzlich zu den, aus dem jeweiligen Organismus isolierten Fragmenten wird in jedem Fall ein dominantes selektionierbares Merkmal benötigt. Transformation kann sowohl über autonom replizierende Plasmide als auch über homologe Rekombination und illegetime Integration aufgenommener DNA erreicht werden. In *Neurospora crassa* (Case et al.,1979) und *Aspergillus nidulans* (Ballance et al., 1983) konnte ein Transformationssystem auch ohne autonom replizierende Vektoren etabliert werden. Nach Erstellung der Transformationsbedingungen können dann in einem

zweiten Schritt direkt im homologen System Sequenzen isoliert werden, die autonome Replikation ermöglichen (Rochaix et al., 1984; Wright et al.,1986). In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, mit den isolierten *U.maydis* ARS Plasmiden autonome Replikation von Plasmiden in *U.maydis* zu erreichen. Die Komplementation auxotropher *Ustilago maydis* Mutanten diente als selektionierbares Merkmal. Ein vergleichbarer Weg führte zu Transformation bei *Mucor circinelloides* (Van Heeswijck und Roncero, 1984). Überraschenderweise zeigte sich in Vorversuchen, daß die durch UV-Bestrahlung induzierten *U.maydis* Mutanten unter den gewählten Spheroplastierungs-und Transformationsbedingungen stark revertierten. Mit diesen Mutanten konnte somit nicht gearbeitet werden. Anscheinend sind die durch UV-Bestrahlung induzierten Mutationen Punktmutationen. Es ist unklar, wie der dramatische Anstieg der Reversionsraten nach Spheroplastierung und Regeneration zustande kommt. Die Reversionsrate von *U.maydis* Mutanten muß in Zukunft sowohl für Sporidien als auch für Spheroplasten bestimmt werden. Zur Herabsetzung der Reversionsrate bietet sich die Konstruktion von *U.maydis* Doppelmutanten an.

In einem anderen, in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experiment, wurde die Transformation von *U.maydis* mit Plasmiden, die prokaryotische Resistenzgene enthalten, versucht. Die hierzu ausgewählten Gene waren APH (3')I und APH (3')II, die in Eukaryoten Resistenz gegen aminoglykosidische Antibiotika wie Kanamycin, Neomycin und G418 vermitteln (Hollenberg, 1979; Jiminez und Davies, 1980; Southern und Berg, 1982). Das APH (3')IIGen wurde mit dem frühen SV40 Promotor und dem Polyadenylierungssignal der frühen SV40Gene (Abb. 18) in zwei pURY Plasmide insertiert und nach Transformation von Hefe in einem zweiten Schritt auf Expression in Hefe analysiert. Die Expression in Hefe konnte nicht nachgewiesen werden (Selektion mit G418). Hollenberg (1979) erreichte die Expression des APH (3')I Gens in Hefe erst nach Zugabe von Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle. Das APH (3')I Gen (unter Kontrolle des APH (3')I eigenen Promotors) in pURY-neo 3 Plasmiden hingegen wurde in Hefe auf Normalmedien exprimiert. Der Versuch der Transformation von *U.maydis* mit den konstruierten pURY-neo Derivaten (Abb.18) und dem von Banks (1983b) zur Transformation von *U.maydis*

benutzem pMP81 Plasmid (Hollenberg, 1979) führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie mit der Transformation von auxotrophen *U.maydis* Mutanten. *U.maydis* Sporidien und Spheroplasten verhielten sich unter selektiven Bedingungen unterschiedlich. Die spheroplastierten *U.maydis* Zellen wuchsen auf G418 Konzentrationen, die bei *U.maydis* Sporidien zur vollständigen Wachstumsinhibition führten. Auch hier muß die optimale Hemmkonzentration von *U.maydis* Sporidien und Spheroplasten getrennt ermittelt werden. Die von Banks (1983b) beschriebene sehr ineffiziente Transformation von *U.maydis* wurde durch Selektion mit Neomycin erreicht. Die von ihm beschriebenen *U.maydis* Transformanden zeigten die, auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen typischen koloniemorphologischen Veränderungen, die mich dazu veranlaßten die Selektion von Transformanden nicht mit Neomycin durchzuführen. Nur in einigen der von Banks (1983b) erhaltenen Transformanden war Plasmid DNA nachzuweisen, während andere offensichtlich spontan Neomycin resistent geworden waren. Die unterschiedlichen Versuchsergebnisse sind möglicherweise auf Verwendung anderer Ausgangsstämme zurückzuführen. Festzuhalten bleibt jedoch, daß keine der bisher verwendeten Vektoren für generelle Transformation der Species *U.maydis* verwendbar ist. Für zukünftige Experimente bietet es sich an, die Expression von Restistenzgenen (z.B. Neomycinresistenz oder Hygromycinresistenz (Gritz und Davies, 1983; Santerre et al., 1984; Kaster et al., 1984; Waldron et al., 1985) in *U. maydis* über *U.maydis* Promotorsequenzen sicherzustellen. Dazu könnten die pURY-neo Plasmide nach "Shotgun Klonierung" von *U.maydis* DNA in eine Schnittstelle vor den Neomycin Resistenzgenen verwendet werden. Als alternative Transformationstechnik bietet sich die Elektroporation (Neumann et al., 1982) an. Hiermit wird der Schritt der Spheroplastierung von *U.maydis* und damit das Problem der erhöhten Mutationsraten umgangen.

5. LITERATUR

S. Avital und D. Elson (1969). A convenient procedure for preparing transfer ribonucleic acid from *E.coli*.
Biochim. Biophys. Acta *179*, 297-307.

D.J. Ballance, F.P. Buxton und G. Turner (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. *112*, 284-289.

G.R. Banks (1983a). Chromosomal DNA sequences from *Ustilago maydis* promote autonomous replication of plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*.
Curr. Genet. *7*, 79-84.

G.R. Banks (1983b). Transformation of *Ustilago maydis* by a plasmid containing yeast 2-micron DNA.
Curr. Genet. *7*, 73-77.

D. Beach, M. Piper und S. Shall (1980). Isolation of chromosomal origins of replication in yeast.
Nature *284*, 185-187.

G.W. Beadle und E.L. Tatum (1945). *Neurospora II*. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. Amer. J. Bot. *32*, 678-686.

J.D. Beggs (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature *275*, 104-109.

M.W. Bevan und R.B. Flavell (1983). A chimaeric antibiotic resistence gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature *304*, 184-187.

H.C. Birnboim und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. *7*, 1513-1523.

N. Blin und D.W. Stafford (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes.
Nucl. Acids Res. *3*, 2303-2308.

K.S. Bloom, M. Fitzgerald-Hayes und J. Carbon (1982). Structural analysis and sequence organisation of yeast centromeres. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *47*, 1175-1186.

F. Bolivar, R.L. Rodrigues, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heynecker und H.W. Boyer (1977). Construction and characterization of new clon ng vehicles.II. A multipurpose cloning system. Gene *2*, 95-113.

D. Botstein, S.C. Falkow, S.E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D.T. Stichcomb, K. Struhl, R.W. Davis (1979). Sterile host yeasts (*shy*): A eucaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. Gene *8*, 17-24

H.W. Boyer und D. Roulland-Dussoix (1969). A Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. *41*, 459-472.

J. Broach, Y. Li, J. Feldman, M. Jayaram, J. Abraham, K. Nasmyth und J. Hicks (1983). Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *47*, 1165-1173.

W.M. Brown, M. George und A.C. Wilson (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. *76*, 1967-1971.

W.M. Brown (1980). Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. *77*, 3605-3609.

A. Burmester und J. Wöstemeyer (1986). Cloned mitochondrial DNA from the zygomycete *Absidia glauca* promotes autonomous replication in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. *10*, 435-441.

M.E. Case, M.Schweizer, S.R. Kushner und N.H. Giles (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. *76*, 5259-5263.

J. Casey und N. Davidson (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucl. Acids Res. *4*, 1539-1552.

S.E. Celniker und J.L. Campbell (1982). Yeast DNA replication in vitro: Initiation and elongation events mimic in vivo processes. Cell *31*, 201-213.

S.E. Celniker, K. Sweder, F. Srienc, J.E. Bailey und J.L. Campbell (1984). Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS 1 of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. *4*, 2455-2466.

J.J. Christensen (1931). Studies on the genetics of *Ustilago zeae*. Phytopath. Ztschr. *4*, 129-188.

D.B. Clewell (1972). Nature of *Col E 1* plasmid replication in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol. *110*, 667-676.

C.S.M. Chan und B.R.K. Tye (1980). Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*, 6329-6333.

L. Clark und J. Carbon (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature *287*, 504-509.

S. Cohen, A.C.Y. Chang und C. Hse (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E.coli* R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *36*, 344-355.

F. Colbère-Garapin, F. Horodniceanu, P. Kourilsky und A.-C. Garapin (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. J. Mol. Biol. *150*, 1-14.

R.A. Collins und A.M. Lambowitz (1983). Structural variations and optional introns in the mitochondrial DNAs of Neurospora strains isolated from nature. Plasmid *9*, 53-70.

T.G. Cooper (1981). Biochemische Arbeitsmethoden 61-125. Verlag Walter de Gruyter, Berlin..

J. Davis und D.I. Smith (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Ann. Rev. Microbiol. *32*, 462-518.

P.R. Day und S.L. Anagnostakis (1971). Corn smut dicaryon in culture. Nat. New Biol. *231*, 19-20.

P.R. Day, S.L. Anagnostakis, J.E. Puhalla (1971). Pathogenicity resulting from mutation at the b locus of *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *68*, 533-535.

P.D. Day (1981). Fungal virus populations in Corn smut from Conneticut. Mycologia *73*, 379-391.

S.S. Dhawale, J.V. Paletta und G.A. Marzluf (1984). A new rapid and efficient transformation procedure for Neurospora. Curr. Genet. *8*, 77-80.

K. Esser, U. Kück, H.D. Osiewacz, U. Stahl und P. Tudzynski (1984). Plasmids in Eucaryotes. Springer Verlag, Berlin und New York.

F. Fasiolo, J. Bonnet und F. Lacrout (1981). Cloning of the yeast methionyl-tRNA synthetase gene. J. Biol. Chem. *256*, 2324-2328.

P. Filetici, N. Junakovic und P. Ballario (1985). Rapid alkaline preparation for yeast circular covalently closed DNA molecules. Curr. Genet. *9*, 123-126.

G.R. Fink und C.A. Styles (1972). Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *69*, 2846-2849.

K. Flachs (1953). Leitfaden zur Bestimmung der wichtigsten parasitären Pilze. 105-106. Verlag Luipold Lang, München.

H.Fränkel-Conrat, B.Singer und A. Tsugita (1961). Purification of viral RNA by means of bentonite. Virology *14*, 54-58.

R.C. Garber und O.C. Yoder (1984). Mitochondrial DNA of the filamentous ascomycete *Cochlilobus heterostropus*. Curr. Genet. *8*, 621-628.

H. Garoff und W. Ansorge (1981). Improvement of DNA sequencing gels. Anal. Biochem. *115*, 450-457.

P. Gill, A.J. Jeffreys und D.J. Werrett (1985). Forensic application of DNA fingerprint. Nature *318*, 577-579.

L. Gritz und J. Davies (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Gene *25*, 179-188.

M.J. Haas und J.E. Dowding (1975). Aminoglycoside modifying enzymes. in Methods in Enzymology *43*, S.P. Colowick und N.O. Kaplan Hrsg. Academic Press, New York.611-627.

D. Hanahan (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. in DNA cloning,a practical approach. Vol.I D. Rickwood und B.D. Hames Hrsg. IRL Press. 109-135.

L. Hankin und J.E. Puhalla (1971). Nature of a factor causing interstrain lethality in *Ustilago maydis*. Pythopathology *61*, 50-53.

W.F. Hanna (1929). Studies in the physiology and cytology of *Ustilago zea* and *Sorosporium reilianum*. Phytopath. *19*, 415-443.

L.H. Hartwell, H.T. Hutchinson, T.M. Holland und C.S. Mc Laughlin (1970). The effect of cycloheximide upon polyribosome stability in two yeast mutants defective respectively in the initiation of polypeptide chains and in messenger RNA synthesis. Mol. Gen. Genet. *106*, 347-361.

T. Helentjaris, G. King, M. Slocum, C. Siedenstrang und S. Wegman (1985). Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol. *5*, 109-118.

L. Herrera-Estrella, M. De Block, E. Messens, J.-P. Hernalsteens, M. van Montagu und J. Schell (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J. *2*, 987-995.

A. Hinnen, J.B. Hicks und G.R. Fink (1978). Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *75*, 1929-1933.

W.E. Hintz, M. Mohan, J.B. Anderson und P.A. Horgen (1985). The mitochondrial DNAs of Agraicus: Heterogeneity in *A.bitorgius* and homogeneity in *A.brunnescens*. Curr. Genet. *9*, 127-132.

K. Hirth, C.A. Edwards und R.A. Firtel (1982). A DNA-mediated Transformation system for *Dictyostelium discoideum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*, 7356-7360

C.P. Hollenberg (1979). The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of bacterial ß-lactamase and other antibiotic resistance genes integrated in a 2-micron DNA vector. In Extachromosomal DNA. D.J. Cummings, P. Borst, I.B. Dawid, S.M. Weissmann und C.F. Fox, Hrsg. (Academic Press, New York), s. 325-338.

R. Holliday (1961a). The Genetics of *Ustilago maydis*. Genet. Res. Camb. *2*, 204-230.

R. Holliday (1961b). Induced mitotic crossing over in *Ustilago maydis*. Genet. Res. Camb. *2*, 231-248.

R. Holliday (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics. R.C. King, Hrsg. Vol.1, s. 575-595.

W.H. Hsu, P.T. Magee, B.B. Magee, C.A. Reddy (1983). Construction of a new yeast cloning vector containing autonomous replication sequences from *Candida utilis*. J. Bacteriol. *154*, 1033-1039.

H. Ito, Y. Fukada, K. Murata und A. Kimura (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. *153*, 163-168.

A. Jimenez und J. Davis (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature *287*, 869-871.

K.R. Kaster, S.G. Burgett und T.D. Ingolia (1984). Hygromycin B as dominant selectable marker in yeast. Curr. Genet. *8*, 353-358.

S.Kearsey (1984). Structural requirements for the function of a yeast chromosomal replicator. Cell *37*, 299-307.

H.Klenow und I.Henningsen (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the DNA polymerase from *E.coli* B by limited proteolysis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *65*, 168-175.

H.Kojo, B.D.Greenberg und A.Sugino (1981). Yeast 2-µm plasmid DNA replication in vitro: origin and direction.Proc.Natl.Acad. Sci.USA *78*, 7261-7265.

B.Koller und H.Delius (1982). Origin of replication in chloroplast DNA of *Euglena gracilis* located close to the region of variable size. EMBO J. *1*, 995-998.

Y.Koltin und P.R.Day (1976a).Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis* Proc.Natl.Acad.Sci. USA *73*, 594-598.

Y.Koltin und P.R.Day (1976b). Suppression of the killer phenotype and dsRNA in *Ustilago maydis*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA *73*, 594-598.

Y.Koltin,I.Mayer und R.Steinlauf (1978). Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: mapping viral functions. Mol. gen. Genet. *166*, 181-186.

W.Krüger (1984). Über den Befall des Maises mit Maisbeulenbrand *Ustilago maydis* (DC.) CDA.) und dessen Vererbung.Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft *221*, 33-37.

I.B.Lazdins und D.J.Cummings (1982). Autonomously replicating sequences in young and senescent mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. Curr.Genet. *6*, 173-178.

I. Ladzdins und D. Cummings (1984). Structural and functional analysis of the origin of replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. II. A-T rich units serve as autonomously replicatingsequences. Curr. Genet. *8*, 483-487.

S. Leaper, M.A. Resnick, R. Holliday (1980). Repair of double strand breaks and lethal damage in DNA of *Ustilago maydis*. Genet. Res. Camb. *35*,291-307.

J. Lederberg und E.M. Lederberg (1951). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. *63*, 399-406.

J.A. Lippincott und G.T. Heberlein (1965). The induction of leaf tumors by *Agrobacterium tumefaciens*. Amer. J. Bot. *52*, 396-403.

D. Lonsdale, T.P. Hodge und C.M.-R. Fauron (1984). The physical map and organisation of the mitochondrial genome from fertile cytoplasm of maize. Nucl. Acids Res. *12*, 9249-9261.

R. Loppes und C. Denis (1983). Chloroplast and nuclear DNA fragments from *Chlamydomonas* promoting high frequency transformation of yeast. Curr. Genet. *7*, 473-480.

C.R. Mc Arthur und G. D. Clark-Walker (1983). Mitochondrial DNA size diversity in the Dekkera / Brettanomyces yeast. Curr. Genet. *7*, 29-35.

B.L. McConaughy, C.D. Laird und B.J. Mc Carthy (1969). Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry *8*, 3289-3295.

J.Messing, R. Crea und P.H. Seeburg (1981). A system for shotgun DNA sequencing. Nucl. Acids Res. *9*, 309-321.

J. Messing und J. Vieira (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments. Gene *19*, 269-276.

J.H. Miller (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, NY.

A.W. Murray und J.W. Szostak (1983). Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. Cell *34*, 961-970.

E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P.H. Hofschneider (1982). Gene transfer into mouse L-cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. *1*, 841-845.

T. Ohtani, S. Kiyokawa, T. Ohgawara, H. Harado, H. Uchimiya (1985). Nucleotide sequence and stability of a Nicotiana nuclear DNA segment possessing autonomously replicating ability in yeast. Plant Mol. Biol. *5*, 35-39.

J.D. Palmer und C.R. Shields (1984). Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. Nature *307*, 437-440.

W.J. Peacock und E.S. Dennis (1986). Plant gene engineering and plant agriculture. in Dahlem Workshop Reports. Life Sciences Research Report *35*, Biotechnology: Potentials and Limitations, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, 223-239.

G. Pontecorvo, J.A. Roper, L.M. Hemmons, K.D. Mc Donald und A.W.J. Bufton (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advanc. Genet. *5*, 142-238.

J.E. Puhalla (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics *60*, 461-474.

J.E. Puhalla (1970). Genetic studies of the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. Genet. Res. *16*, 229-232.

U. Raeder und P.Brode (1986). Meiotic segregation analysis of restriction site polymorphisms allows rapid genetic mapping. EMBO J. *5*, 1125-1127.

J.E. Ramberg und D.J. Mc Laughlin (1980). Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. Canad. J. Bot. *58*, 1548-1561.

N. Rao und S.G. Rogers (1979). Plasmid pKC7: a vector containig ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments. Gene *7*, 79-82.

P. Ravel-Chappuis, P. Heizmann und V. Nigon (1982). Electron microscopic localization of the replication origin of *Euglena gracilis* chloroplast. Nature *300*, 78-81.

P.W.J. Righby, M. Diekmann, D.Rhodes und P. Berg (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by "nick translation" with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. *113*, 237-251.

D.A. Roberts und C.W. Boothroyd (1975). Diseases affecting meristematic activity-smuts. In: Fundementals of Plant Pathology, Freeman Publ., London, 214-221.

R.J. Roberts (1983). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucl. Acids Res. *11*, 135-158.

J.-D. Rochaix, J. van Dillewjin und M. Rahire (1984). Construction and characterization of autonomously replicating plasmids in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardii*. Cell *36*, 925-931.

G.E. Roth, H. Blanton, L.J. Hager und V.A. Zakian (1983). Isolation and characterization of sequences from mouse chromosomal DNA with ARS function in yeast. Mol. Cell Biol. *3*, 1898-1908.

J.B. Rowell (1955). Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. Phytopath. *45*, 370-374.

J.B. Rowell und J.E. De Vay (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. Phytopath. *44*, 356-362.

F. Sanger, S. Nicklen und A.R. Coulson (1981). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *74*, 5436-5467.

R.F. Santerre, N,E. Allen, J.N.Hobbs, R.N. Rao und R.J. Schmidt (1984). Expression of prokaryotic genes for hygromycin B and G418 resistance as dominant selection markers in mouse L-cells. Gene *30*, 147-156.

S. Scherer und R.W. Davis (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. *76*, 4951-4955.

B. Schulz (1986). Phytopathogentät von *Ustilago maydis:* Die Interaktion zwischen Pilz- und Pflanzenzelle. Diplomarbeit.

F. Sherman, G.R. Fink und C.W. Lawrence (1979). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory press Cold Spring Harbor, New York.

P.L. Skatrud und S.W. Queener (1984). Cloning of a DNA fragment from *Cephalosporium acremonium* which functions as an autonomous replication sequence in yeast. Curr. Genet. *8*, 155-163.

E.M. Southern (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. *98*, 503-517.

P.J. Southern und P. Berg (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Appl. Genet. *1*, 327-341.

K. Sreenkrishna, T.D. Webster und R.C. Dickson (1984). Transformation of *Kluyveromyces lactis* with the kanamycin (G418) resistance gene of Tn903. Gene *28*, 73-81.

E.C. Stakman und J.J. Christensen (1927). Heterothallism in *Ustilago zeae*. Phytopath. *17*, 827-834.

D.T. Stinchcomb, C. Mann und R.W. Davis (1982). Centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae* . J. Mol. Biol. *158*, 157-179.

D. T. Stinchcomb, C. Mann, E. Selker und R.W. Davis (1981). DNA sequences that allows the replication and segregation of yeast chromosomes. in: The Initiation of DNA replication (C.F. Fox Hrsg.) ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology Vol. XXII, Academic Press 1981, 473-488.

D.T. Stinchcomb, K. Struhl und R.W. Davis (1979). Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature *282*, 39-43.

D.T. Stinchcomb, M. Thomas, J. Kelly. E. Selker und R.W. Davis (1980). Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*,4559-4563.

J. W. Szostak und E.H. Blackburn (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmids vectors. Cell *29*, 245-255.

L.P. Tikhomirova, V. Kryukov, N.I. Strizov und A.A. Bayev (1983). mt DNA sequences of *Candida utilis* capable of supporting autonomous replication of plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. *189*, 479-484.

J. Tilburn, C.Scazzocchio, G.G. Taylor, J.H. Zabicky-Zissman, R.A. Lockington und R.W. Davies (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene *26*, 205-221.

G. Turner und D.J. Ballance (1985). Cloning and transformation in *Aspergillus*.in: Gene manipulations in fungi (J.W. Bennett und L.L. Lasure, Hrsg.) 259-278, Academic press, INC.

P. Tudzynski und K.Esser (1979). Chromosomal and extra-chromosomal control of senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. Molec. gen. Genet. *173*, 71-84.

P. Tudzynski und K. Esser (1982). Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. II. Development of a mitochondrial DNA hybrid vector replicating in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. *6*, 153-158.

P. Tudzynski und K. Esser (1985). Mitochondrial DNA for gene cloning in eukaryotes. in: Gene manipulations in fungi. (J.W. Bennett und L.L.Lasure, Hrsg.) 403-416, Academic press,INC.

P.Tudzynski, U. Stahl und K. Esser (1980). Transformation to senescence with plasmid like DNA in the ascomycete *Podospora anserina*. Curr. Genet. *2*, 181-184.

A. Ullmann und D. Perrin (1970). Complementation in ß-Galactosidase. In The lactose operon. (J.R. Beckwith und D. Zipser Hrsg.) Cold Spring Harbor. s.143-172.

R. van Heeswijck und I. Roncero (1984). High frequency transformation of mucor with recombinant plasmid DNA. Carlsberg Res. Commun. *49*, 691-702.

J.-M. Vallet, M. Rahire und J.-D. Rochaix (1984).Localization and sequence analysis of chloroplast DNA sequences of *Chlamydomonas reinhardii* that promote autonomous replication in yeast. EMBO J. *3*, 415-421.

J. Vieira und J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene *19*, 259-268.

M. Vodkin, F. Kattermann und G.R. Fink (1974). Yeast killer mutants with altered double- stranded ribonucleic acid. J. Bacteriol. *117*, 681-685.

J. Waddel, X.M. Wang, M. Wu (1984). Electronmicroscopic localization of the chloroplast DNA replicative origins in *Chlamydomonas reinhardii*. Nucl. Acids Res. *12*, 3843-3856.

C. Waldron, E.B. Murphy, J.L. Roberts, G.D. Gustafson, S.L. Armour und S.K. Malcolm (1985). Resistance to hygromycin B. Plant Mol. Biol. *5*, 103-108.

D.H. Williamson, E. Moustachi und D. Fennell (1971). A procedure for rapidly extracting and estimating the nuclear and cytoplasmic DNA components of yeast cells. Biochim. Biophys. Acta *238*, 369-374.

D.H. Williamson (1985). The yeast ARS element,six years on: a progress report. Yeast *1*, 1-14.

E.A. Wood und R.F. Bozarth (1973). Heterocaryon transfer of virus like particles associated with a cytoplasmically inherited determinant in *Ustilago maydis*. Phytopath. *63*, 1019-1021.

A.P.H. Wright, K. Maundell und S. Schall (1986). Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by nonhomologous unstable integration in the genome. Curr. Genet. *10*, 503-508.

T. Yamada, M. Schimaji und Y. Fukuda (1986). Characterization of a chloroplast DNA sequence from *Chlorella ellipsoidea* that promotes autonomous replication in yeast. Plant Mol. Biol. *6*, 245-252.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden ARS-Fragmente des phytopathogenen Pilzes *Ustilago maydis* isoliert und charakterisiert. Alle Fragmente waren mitochondrialen Ursprungs. Eine Verkürzung der mitochondrialen ARS-Fragmente führte zu reduzierter mitotischer Stabilität, die Stimulierung der hohen Transformationseffizienz von Hefestämmen blieb erhalten. Es wurde gezeigt, daß die Stimulierung der hohen Transformationseffizienz durch verschiedene, die ARS Konsensusregion flankierende Sequenzen erfolgen kann.

Die *U.maydis* ARS Plasmide wurden als Vektoren verwendet, um Transformation von *U.maydis* durch Komplementation auxotropher *U.maydis* Mutanten zu erreichen. Ferner wurde versucht über klonierte,prokaryotische Resistenzgene dominante Selektionsmarker einzuführen.Bei Durchführung der Transformationsprozedur zeigte sich, daß protoplastierte *U.maydis* Zellen ein anderes Verhalten in Bezug auf die selektionierbaren Merkmale aufwiesen als die getesteten Sporidien. Transformation von *U.maydis* konnte daher nicht nachgewiesen werden.

7. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Ap^r	Ampicillin resistent
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAA	Casaminoacids
Cm^r	Chloramphenicol resistent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Threo - 1,4 - dimercapto - 2,3 - butandiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Etbr	Ethidiumbromid
G	Guanin
IPTG	Isopropylthio-ß-galactosid
Km^r	Kanamycin resistent
kb	
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tc^r	Tetracyclin resistent
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
Tris	Tris- Hydroxymethylaminomethan
X-Gal	5- Bromo-4- chloro-3- indolyl-ß-D- galactosid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Ihr Interesse am Ustilagoprojekt bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Regine Kahmann für die interessante Themenstellung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten.

Frau Hannelore Markert möchte ich für das Tippen der Arbeit herzlich danken.

LEBENSLAUF

Name:	Marlis Dahl
Geburtsdatum:	27.06.1957
Geburtsort:	Preetz
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1963 - 1967	Besuch der Wilhelminen Schule in Preetz
1967 - 1976	Besuch des Friedrich-Schiller-Gymnasiums in Preetz, Abschluß: Abitur
Oktober 1976	Beginn des Biologiestudiums an der Christian Albrecht Universität Kiel
April 1977 - April 1983	Fortführung des Studiums der Biologie an der Freien Universität Berlin
22. Januar 1979	Vordiplom im Studiengang Biologie
Nov. 1981 - Nov. 1982	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. B. Wittig, Freie Universität Berlin, Fachbereich natur- und sozialwissenschaftliche Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie Titel: "tRNA Gene aus Hühnerembryonen: Subklonierung und partielle Sequenzierung"
seit 1983	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Kahmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Otto-Warburg-Laboratorium, Berlin Titel: "Entwicklung eines Transformationssystems für *Ustilago maydis*"